



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Detaillierte Analyse humaner Lactobacillenhabitats

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Cathrin Janitschek
Matrikel-Nummer:	0100009
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Diplomstudium Genetik-Mikrobiologie
Betreuerin / Betreuer:	Prof. Dr. Angela Witte, Dr. Konrad Domig

Wien, im Dezember 2010

Danksagung

Mein Dank gilt ganz besonders Frau a.o. Univ. Prof. Dr. Angela Witte und Herrn Dipl.-Ing. Dr. Konrad Domig für die Möglichkeit diese überaus interessante Diplomarbeit über ein Thema, dessen Bedeutung aktueller denn je ist, anfertigen zu können.

Weiters möchte ich Frau Dr. Sigrid Mayrhofer sowie den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Lebensmittelmikrobiologie und –hygiene für ihre Unterstützung danken.

Ein weiterer und ganz besonderer Dank gilt Frau Mag. Iris Krondorfer. Durch zahlreiche Diskussionen, in denen sie mir viele Anregungen gab, trug sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und Lukas Schlegl das wohl wichtigste Dankeschön aussprechen. Sie haben mir mein Studium ermöglicht, indem sie mir die größtmögliche Unterstützung sowohl in finanzieller als auch moralischer Hinsicht zuteil werden ließen und mir stets verständnisvoll zur Seite gestanden sind.

Meinen Eltern möchte ich diese Diplomarbeit in Dankbarkeit widmen.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Allgemeines zur Gattung Lactobacillus	1
1.1.1. Taxonomie und Eigenschaften	1
1.1.2. Vorkommen und Lebensraum von Lactobacillen	3
1.1.3. Positive Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit	4
1.1.4. Durch Lactobacillen verursachte Infektionen	5
1.2. Humane Lactobacillus-Mikrobiota	6
1.2.1. Orale Lactobacillen	6
1.2.2. Intestinale Lactobacillen	8
1.2.3. Vaginale Lactobacillen	10
1.3. Probiotika – Verwendung der Lactobacillen als pharmazeutisches Produkt	12
2. Aufgabenstellung	14
3. Material und Methoden	15
3.1. Mikrobiologische Methoden	15
3.1.1. Einleitung	15
3.1.2. Herstellung der Nährmedien	16
3.1.3. Semiquantitative Keimzahlbestimmung	18
3.1.4. Subkultivierung von Einzelkolonien	19
3.1.5. Zellernte	20
3.2. Molekularbiologische Methoden	22
3.2.1. Einleitung	22
3.2.2. DNA-Isolierung	22
3.2.3. PCR – Polymerase Chain Reaction	24
3.2.4. Agarose Gelelektrophorese	33
3.2.5. DGGE – Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese	38
3.2.6. Reinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung	43
3.2.7. Sequenzierung	44
4. Ergebnisse	45
4.1. Mikrobiologische Ergebnisse	45
4.1.1. Semiquantitative Keimzahlbestimmung	45
4.1.2. Subkultivierung von Einzelkolonien	48
4.2. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen	49

4.2.1. Gattungs-spezifische PCR	49
4.2.2. Multiplex-PCR	60
4.2.3. Art-spezifische Multiplex- PCR.....	65
4.2.4. Sequenzierungsergebnisse.....	79
4.2.5. Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE).....	85
5. Diskussion	111
5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse der schwangeren Probandinnen.....	111
5.2. Ergebnisse der postmenopausalen Frauen	115
5.2.1. Ergebnisse der Multiplex-PCR und Art-spezifischer Multiplex-PCR....	115
5.2.2. Ergebnisse von Abstrich 2 – PCR-DGGE	118
5.3. Vergleich der Ergebnisse.....	120
5.4. Zusammenfassung und Interpretation	132
6. Zusammenfassung	136
7. Abstract	138
8. Literatur	139
9. Anhang	145
9.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	145
9.3. Abbildungsverzeichnis	152
Lebenslauf	155

1. Einleitung

1.1. *Allgemeines zur Gattung Lactobacillus*

Lactobacillen zählen neben anderen Arten, wie beispielsweise Enterococcen, zur Gruppe der Lactic Acid Bacteria (LAB), also der Milchsäurebakterien, deren primäres Fermentationsendprodukt Milchsäure ist. [CANCHAYA, 2006]

Ihre Habitate sind verschieden und reichen von Schleimhäuten der Menschen und Tiere über Pflanzen und Material pflanzlichen Ursprungs bis hin zu künstlich von Menschen erzeugten Habitaten wie Silage oder fermentierten Lebensmitteln. Seit das Wissen über die Anwendungsbereiche von Lactobacillen weiter gewachsen ist, eröffnen sich immer mehr neue Möglichkeiten sie in der Lebensmitteltechnologie als Starterkulturen und Nahrungsmittelzusätze, sowie als pharmazeutische Produkte (Probiotika) zu verwenden [BERNARDEAU et al., 2008].

1.1.1. Taxonomie und Eigenschaften

Die Gattung *Lactobacillus* ist die größte Gruppe innerhalb der *Lactobacteriaceae* und umfasst weit über 100 Arten [CANCHAYA et al., 2006]. Manche Arten der Gattung *Lactobacillus* sind einige der wichtigsten Taxa, die in der Lebensmittelfermentation und der menschlichen Ernährung eingesetzt werden. Das ist auf ihre Rolle zurückzuführen, die sie in der Lebensmittel- und Futtermittelproduktion spielen. Bei einigen Stämmen konnte auch eine probiotische Wirkung nachgewiesen werden.

Lactobacillen sind Gram-positive Bakterien, die keine Sporen ausbilden. Sie können als Stäbchen oder auch als kokkoide Stäbchen vorkommen. Sie sind fermentativ, mikroaerophil, sowie chemo-organotroph.

Weiters sind sie in der Regel Catalase-negativ, auch wenn Pseudocatalase Aktivität in einigen Stämmen vorkommen kann.

Der GC-Gehalt bei Lactobacillen liegt für gewöhnlich unter 54 mol%, kann aber innerhalb der Gattung stark schwanken, etwa zwischen 33-55% [FELIS et al., 2007; BERNARDEAU et al., 2008].

Sie sind strikt fermentativ, aerotolerant oder anaerob, acidophil und haben komplexe Nährstoffansprüche (Kohlenhydrate, Aminosäuren, Peptide, Fettsäureester, Salze, Nukleinsäurederivate, Vitamine).

1901 wurde die Gattung *Lactobacillus* erstmals von Beijerinck beschrieben. Orla-Jensen unterteilte sie 1919 dann in drei Untergruppen: *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Betabacterium* – entsprechend ihrer optimalen Wachstumstemperatur und ihres Hexose-Abbau Weges [BERNARDEAU et al., 2006].

Die Nomenklatur der Lactobacillen wurde mittlerweile mehrmals wegen der ständig wachsenden Zahl an bekannten Arten reorganisiert.

Aufgrund ihrer fermentativen Eigenschaften werden sie in folgende drei Gruppen unterteilt:

1. obligat homofermentativ: Über den Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) Weg fermentieren Lactobacillen Hexosen zu Milchsäure. Pentosen und Gluconate dagegen werden nicht fermentiert, da ihnen Phosphoketolase fehlt.
2. fakultativ heterofermentativ: Lactobacillen bauen Hexosen über den EMP Weg zu Milchsäure ab und können ebenso auch Pentosen und oftmals Gluconate abbauen.
3. obligat heterofermentativ: Lactobacillen bauen Hexosen über den Phosphogluconat Weg ab.

[STILES et al., 1997; BERNARDEAU et al., 2006; FELIS et al., 2007]

Bei der homofermentativen Verwertung von Glucose können Lactobacillen mehr als 85% Milchsäure aus Glucose produzieren, bei der heterofermentativen produzieren sie Milchsäure, CO₂, Ethanol und/oder Essigsäure in equimolaren Mengen [HAMMES und HERTEL, 2006].

Weiters gibt es noch eine auf phylogenetische Merkmale bezogene Nomenklatur, die ebenfalls drei Gruppen umfasst:

1. *Lactobacillus delbrueckii* Gruppe
2. *Lactobacillus casei*/*Pediococcus* Gruppe
3. *Leuconostoc* Gruppe

[BERNARDEAU et.al, 2006]

Mittels weiterer Untersuchungen, basierend auf 16S rRNA Genen, konnte die große Diversität dieser Gattung nachgewiesen werden. Ständig werden neue *Lactobacillus* Arten beschrieben, wobei auch bereits bestehende umbenannt (z.B. *Lactobacillus bavaricus* wurde in *Lactobacillus sakei* umbenannt) und einige frühere zu neuen Gattungen reklassifiziert werden.

Diese taxonomischen Veränderungen sind ein kontinuierlicher Prozess: 1986 wurden noch 44 Arten und 11 Unterarten beschrieben, im Oktober 2008 waren es bereits 149 Arten, sowie 27 Unterarten [BERNARDEAU et al., 2006; KRONDORFER, 2008].

In der „Approved List of Bacterial Names“ von Jean Paul Euzéby sind zum jetzigen Zeitpunkt (Dezember 2010) 170 Arten sowie 27 Unterarten eingetragen.

Klassifizierung der Gattung *Lactobacillus* [EUZÉBY, 1997]:

- Domäne: *Bacteria*
- Abteilung oder Phylum: „*Firmicutes*“ (Grampositive Bakterien)
- Klasse: *Bacilli* (*Firmibacteria*)
- Ordnung: *Lactobacillales*
- Familie: *Lactobacillaceae*
- **Gattung: *Lactobacillus***

1.1.2. Vorkommen und Lebensraum von Lactobacillen

Lactobacillen sind strikt fermentativ und haben komplexe Nährstoffansprüche. Sie kommen in vielen unterschiedlichen Habitaten vor und spielen auch beim Verderb von Lebensmitteln eine große Rolle:

- Mensch: Mundhöhle, Intestinal- und Vaginaltrakt
- Andere Habitate: Pflanzen und organisches Material, Boden, Wasser, Abwasser und Dung, Lebensmittelfermentation (Milch, Fleisch und Gemüse), Getreideprodukte, Silage

-
- Nahrungsmittelverderb: Bier, Früchte und Getreidemaische, mariniertes Fisch, Zucker-Verarbeitung, Milch, Fleisch und Fleischprodukte sowie fermentierte Getränke

[STILES et al., 1997]

Lactobacillen sind allgegenwärtig in der Ernährung. Sie können bereits auch schon kurz nach der Geburt im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Bei gesunden Menschen kommen sie in der Mundhöhle mit $10^3 - 10^4$ KBE/g, im Dünndarm mit $10^3 - 10^7$ KBE/g, im Dickdarm mit $10^4 - 10^8$ KBE/g vor, sowie als dominierende Mikroorganismen in der Vagina [BERNARDEAU et al., 2008].

Die verschiedenen Arten haben ihr Wachstum an sehr unterschiedliche Umweltbedingungen angepasst und die Produktion von großen Mengen Milchsäure senkt den pH Wert des umgebenden Substrates, dadurch kann das Wachstum vieler anderer Bakterien verhindert werden. Diese Faktoren sind für die weite Verbreitung von Lactobacillen und ihre erfolgreiche Besiedelung von vielen unterschiedlichen Habitaten verantwortlich [HAMMES und HERTEL, 2006].

1.1.3. Positive Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit

Gemeinsam mit der Produktion antimikrobieller Substanzen und der Beeinflussung der Immunantwort des Wirtes, ist die Fähigkeit sich an Schleimhautzellen anzulagern, eine der wichtigsten Charakteristika von Lactobacillen. Diese Eigenschaft ist wichtig für die Kolonisierung der Schleimhaut. Dadurch kann eine weitere Besiedelung mit pathogenen Arten eingeschränkt werden [MERK et al., 2005].

Eine der wohl wichtigsten Aufgaben in der Unterstützung der menschlichen Gesundheit übernehmen Lactobacillen im Vaginaltrakt. Sie tragen zur mikrobiellen Balance des vaginalen Milieus bei, indem sie die Anwesenheit und Verbreitung von Pathogenen verhindern [SANDERS, 1995].

Die vaginale Mikrobiota von gesunden, fertilen Frauen wird von Lactobacillen dominiert. Diese Dominanz der Lactobacillen in der Vagina deutet darauf hin, dass sie eine fundamentale Rolle im Schutz gegen die Entstehung pathogener

Bedingungen spielen. Beispielsweise verhindern sie die exzessive Verbreitung von *Gardnerella vaginalis*, deren dominante Anwesenheit zu einer bakteriellen Vaginose führen kann. Die Kolonisierung von Pathogenen, wie *Candida* spp. und *Trichomonas vaginalis*, die zu einer Vaginitis oder in seltenen Fällen zu einer Cervicitis und anderen regionalen und systemischen Problemen führen können, wird ebenso unterdrückt [MARTIN und SUÁREZ, 2010].

Als Ergebnis des fermentativen Metabolismus und dem Entstehen von Milchsäure, liegt der physiologische pH Wert der Vagina bei etwa 4, wodurch das Wachstum vieler anderer Arten verhindert wird. Eine sehr wichtige Rolle spielt auch die Produktion von H_2O_2 , was erwiesenermaßen zu einer Reduktion der vaginalen Infektionen führt. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der hauptsächlichen Besiedelung mit H_2O_2 -produzierenden Lactobacillen selten zu einer Vaginosis kam (3%). Das Auftreten einer Vaginosis konnte bei einer hauptsächlichen Besiedelung mit H_2O_2 -negativen Stämmen in 25% der Fälle, bei einer Besiedelung mit andern Bakterienarten sogar in 46% nachgewiesen werden [SANDERS, 1995; MARTIN und SUAREZ, 2010].

Martín und Suárez (2010) konnten zeigen, dass es bei *L. jensenii* besonders häufig zur Bildung von H_2O_2 kam, bei *L. crispatus* und *L. gasseri* war es unterschiedlich. In einer anderen Studie zeigte Muench et al. (2009), dass kommensale Lactobacillen, die H_2O_2 produzieren *Neisseria gonorrhoeae in vitro* inhibieren können. Weiters lässt sich aufgrund der klinischen Ergebnisse darauf schließen, dass das Vorkommen dieser Lactobacillen sogar mit einem geringeren Risiko für Gonorrhoe einhergeht [MUENCH et al., 2009].

1.1.4. Durch Lactobacillen verursachte Infektionen

Lactobacillen wurden sehr lange als nicht pathogen betrachtet, außer ihrer Beteiligung an Karies. Oft wurden sie als Kontaminanten oder Sekundär-Eindringlinge angesehen oder einfach fälschlicherweise als Streptococcen identifiziert. Es zeigte sich aber, dass sie als opportunistische Pathogene wirken können (besonders *L. rhamnosus*).

Einige Arten, im speziellen einige Stämme der Arten *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* und die *L. acidophilus* Gruppe, wurden aus Patienten mit subakuter bakterieller Endokarditis isoliert [AGUIRRE und COLLINS, 1993].

Lactobacillen konnten bei einigen Fällen von Endokarditis und Bakteriämie nachgewiesen. Weiters sind sie bei einer Reihe anderer Infektionen beteiligt, wie Peritonitis, Abszessen und Meningitis. [CANNON et al., 2005]

Cannon et al. (2005) konnte bei einem Review von über 200 Fällen eine Gesamt-Mortalitätsrate von beinahe 30% der durch Lactobacillen verursachten Infektionen nachweisen. Es zeigte sich eine signifikante Verbindung zwischen Mortalität und polymikrobieller Infektion. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den Lactobacillen um die am besten nachzuweisende Bakterienart handelt ist dabei allerdings größer, als dass nur die Lactobacillen allein für die Infektionen verantwortlich sind [CANNON et al., 2005].

Bei 0,05-0,4% der Fälle von infektiöser Endokarditis und Bakteriämie konnten Lactobacillen als Ursache nachgewiesen werden. Sie wurden allerdings nur bei acht Proben von 3317 Blutkulturen gefunden, die zwischen 1989 und 1992 in Finnland untersucht wurden. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Auftreten von Lactobacillen-induzierten Blutbahn-Infektionen von 0,24% in Frankreich. In den meisten Fällen ist der Ursprung dieser durch Lactobacillen verursachten Infektionen die kommensale Normalflora des Menschen und nicht oral aufgenommene probiotische Mikroorganismen bzw. Starterkulturen. Weiters gibt es keine Beweise für ein höheres Risiko immunkomprimierter Personen durch Konsumierung von Probiotika an opportunistischen Infektionen zu erkranken [MERK et al., 2005].

1.2. *Humane Lactobacillus-Mikrobiota*

1.2.1. Orale Lactobacillen

Die menschliche und tierische Mundhöhle umfasst mehrere Arten von Epitheloberflächen und ist der einzige Ort, der eine harte nicht behaarte Oberfläche (Zähne) für die mikrobielle Kolonisierung bietet. Die Beschaffenheit und Dichte der mikrobiellen Population unterscheidet sich an den verschiedenen Orten in der Mundhöhle und kann anhand dreier Faktoren bestimmt werden: Ernährung, Redoxpotential und Adhäsion. Weitere Faktoren, welche die mikrobiellen Populationen beeinflussen, sind die genetische Beschaffenheit (Speichelfluss, Geschlecht, hormoneller Status),

der Schluckprozess, das Ernährungsverhalten, die Interaktion zwischen den Mikroorganismen, die Mundhygiene, der Gesundheitsstatus und die Behandlung mit antimikrobiellen Substanzen. Mittlerweile wurden über 700 mikrobielle Arten im Mund nachgewiesen. Den Großteil dieser Bakterien bilden Streptokokken. Lactobacillen machen nur etwa 1 % der kultivierbaren oralen Mikrobiota aus. Davon besiedeln <0,1% die Wangen oder die Zunge, <0,005% den Zahnbelag in den Zahnzwischenräumen und <1% den Speichel und das Zahnfleisch [HAMMES und HERTEL, 2006; MEURMAN et al., 2009]. Die in der Mundhöhle am häufigsten vorkommenden Lactobacillen sind: *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. casei* und *L. acidophilus* [KÖLL et al., 2008; MEURMAN et al., 2009].

L. casei wurde vor allem bei Kindern mit Karies-Läsionen nachgewiesen. Lactobacillen kommen zwar bei kariösen Läsionen vor, sie sind aber vermutlich nicht aktiv an der Karies Entwicklung beteiligt [HAMMES und HERTEL, 2006].

Es gibt nur einige Studien, die sich mit der oralen Kolonisierung von probiotischen Stämmen befassen. Es zeigte sich beispielsweise, dass *L. rhamnosus* GG die Mundhöhle 1-5 Tage bis zu einigen Wochen besiedeln kann. Andererseits konnten bei Probanden eine Woche nach dem Verzehr von Biojoghurt, das zwei unterschiedliche Lactobacillen Stämme enthielt, keine Lactobacillen im Speichel nachgewiesen werden [ÇAGLAR et al., 2009]. Es zeigte sich auch, dass sich durch die Aufnahme von Produkten, die probiotische Lactobacillen enthielten, das Kariesrisiko und die Besiedelung mit *Streptococcus mutans* reduzieren ließ [KÖLL et al., 2008].

Die Verwendung von Lactobacillen als orale Probiotika zur Behandlung unterschiedlichster Krankheiten gewinnt immer mehr an Bedeutung. In der Studie von Jiménez et al., 2008 konnte dies gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Studie lassen darauf schließen, dass *L. salivarius* CECT5713 und *L. gasseri* CECT5714 als eine effektive Alternative zu Antibiotika bei der Behandlung infektiöser Mastitis (Brustdrüsenentzündung) während der Laktation verabreicht werden können. [JIMÉNEZ et al., 2008]

1.2.2. Intestinale Lactobacillen

Der menschliche Darm wird von annähernd $100 \cdot 10^{12}$ Bakterien besiedelt. Die Größe dieser Bakterienpopulation ist ungefähr 10mal größer als die gesamte Anzahl an somatischen- und Keimzellen des Menschen. Viele dieser Bakterien sind essentiell für die normale Physiologie, andere allerdings sind an der Pathogenese vieler entzündlicher Krankheiten wie IBD (Inflammatory bowel disease) und Asthma beteiligt [HILL und ARTIS, 2010; BÄCKHED et al., 2005].

Schon bald nach der Geburt wird der komplette menschliche Gastrointestinaltrakt von einer Unmenge an mikrobiellen Arten mit einer charakteristischen Verteilung kolonisiert. Die allgemeine Aktivität der kommensalen Bakterien im Gastrointestinaltrakt beinhaltet den Schutz gegen Pathogene, die Unterstützung des Immunsystems und positive Effekte auf die Darmgesundheit [VAUGHAN et al., 2002].

Die Hauptaufgaben der Mikrobiota bestehen darin die Nahrung abzubauen, die Nährstoffaufnahme und den Fettstoffwechsel zu beeinflussen, essentielle Nährstoffe aus dem mikrobiellen Metabolismus für den Wirt zur Verfügung zu stellen, sowie der Schutz gegen invasive Pathogene und die Stimulierung der Darmmorphologie. Weiters spielt die Darmmikrobiota eine wichtige Rolle in der Beeinflussung des Immunsystems [MULDER et al., 2009].

Das Darm Mikrobiom, das mehr als 100mal größer als das menschliche Genom ist, trägt dazu bei den menschlichen Körper in den Stoffwechselfunktionen zu unterstützen, die von selbst nicht allzu ausgeprägt sind [BÄCKHED et al., 2005].

In dicht besiedelten Nischen, wie dem Gastrointestinaltrakt, befinden sich Lactobacillen in ständigem Wettbewerb um Nährstoffe mit anderen Bakterien [KLEEREBEZEM et al., 2010].

Die Struktur und die Zusammensetzung der Darmmikrobiota spiegelt natürliche Selektion sowohl auf der mikrobiellen Seite als auch auf Seite des Wirtes wider [BÄCKHED et al., 2005].

Das meiste Wissen über die intestinale Mikrobiota wurde durch Analysen menschlicher Fäzes erhalten [HAMMES und HERTEL, 2006]. Auch die komparative Sequenzanalyse der 16S rRNA Gene trug wesentlich zur Bestimmung und Klassifizierung der Darmbakterien bei [VAUGHAN et al., 2002]. Aufgrund dieser 16S rRNA Analysen konnten die vorherrschenden Bakterien der Darmmikrobiota in zwei Gruppen eingeteilt werden, die Bacteroidetes und die Firmicutes.

Eine weitere Alternative zur 16S rRNA Sequenzanalyse stellt das Metagenomic sequencing dar. Damit ist es möglich komplexe mikrobielle Gemeinschaften zu analysieren. In einer Studie von Qin et al., 2010 wurde die gesamte fäkale DNA von 124 Europäern mittels der Illumina Genome Analyser (GA) Technologie untersucht. Aufgrund dieser Untersuchungen konnte eine Liste der intestinalen mikrobiellen Gene erstellt werden. Diese Liste enthält 3,3 Millionen mikrobielle Gene, 150x mehr als das menschliche Genom [QIN et al., 2010].

Nur bei einem kleinen Teil der Bakterien aus menschlichen Fäzes handelt es sich um Lactobacillen, wohingegen Tiere, wie Schweine, Hühner, Hunde, Mäuse, Ratten und Hamster größere Lactobacillen Populationen in ihrem Darm beheimaten. Die Lactobacillen im menschlichen Darm könnten von fermentierten Nahrungsmitteln, aus der Mundhöhle sowie aus pflanzlicher Nahrung stammen.

Die wichtigsten ökologischen Faktoren, die das mikrobielle Wachstum in fermentativen Darmabschnitten von Säugern beeinflussen sind:

- ein pH Wert zwischen 5,5 bis 6,9 (mit niedrigeren Werten im proximalen und höheren Werten im distalen Kolon)
- Anaerobiose (Redoxpotential zwischen -350 bis -400 mV)
- Temperatur (37-41°C)
- Osmolalität (250-350 mmol/kg)

Bis zu mehr als 10^9 Koloniebildende Einheiten (KBE)/g an Lactobacillen können aus den menschlichen Fäzes isoliert werden.

Lactobacillusarten konnten in allen Teilen des menschlichen Darms nachgewiesen werden. Selbst im Magen bei einem pH Wert von 3. Relativ wenige Bakterienarten können diese sauren Bedingungen tolerieren und die meisten Mikroorganismen, die mit der Nahrung aufgenommen werden, werden durch die Salzsäure getötet. Diese Bedingungen reduzieren die bakterielle Population auf 10^3 KBE/ml, die hauptsächlich aus Lactobacillen und Streptococcen bzw. Enterococcen besteht.

Im Duodenum (Zwölffingerdarm) und im Jejunum (Leerdarm) sind Lactobacillen und Enterococcen die dominierenden Bakterien. Im Ileum wird die Mikrobiota dann komplexer, ähnlich im Dickdarm, und der Anteil an Lactobacillen nimmt ab [HAMMES und HERTEL, 2006].

Durch Kultivierung und mittels PCR Studien fäkaler Proben aus gesunden Menschen konnte gezeigt werden, dass *L. ruminis*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. paracasei* und *Leuconostoc argentinum*, die am häufigsten auftretenden Vertreter der intestinalen Milchsäurebakterien sind. Ähnliche Studien mit fäkalen Proben von Kindern bestätigten das vorwiegende Auftreten von *L. acidophilus*, *L. casei/paracasei* und *L. salivarius* [FAKHRY et al., 2009].

1.2.3. Vaginale Lactobacillen

Die vaginale Mikroflora gesunder Frauen besteht aus einer Vielzahl anaerober und aerober bakterieller Genera und Arten. Dominierend ist hier die fakultative, mikroaerophile, anaerobe Gattung *Lactobacillus* [DONATI et al., 2010]. Mittels Fermentationsprofilen, PCR und amplifizierender rRNA Gen Restriktionsanalyse (ARDRA), sowie mittels denaturierender Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) können sie nachgewiesen werden [MARTINEZ et al., 2008]. Die Aktivität von *Lactobacillus* ist essentiell, um Genitalinfektionen zu verhindern und die natürliche gesunde Balance der Vaginalflora aufrecht zu erhalten. Unter physiologischen Bedingungen sind Lactobacillus Arten in der Lage Milchsäure zu produzieren, wodurch der vaginale pH Wert unter 4,5 liegt. Dadurch kann das Wachstum von nicht

säuretoleranten Mikroorganismen, also potentiell Pathogenen, unterbunden werden [DONATI et al., 2010].

Lactobacillen beeinflussen die vaginale Mikrobiota durch unterschiedliche Mechanismen:

- Autoaggregation
- Produktion von Milchsäure, H_2O_2 und Bakteriocinen
- Koaggregation mit pathogenen Mikroorganismen
- Adhäsion an Epithelialzellen

[GIL et al., 2010]

Viele unterschiedliche Stämme konnten in der Vagina von gesunden Frauen durch Genamplifikation nachgewiesen werden. Am häufigsten traten *L. crispatus* und *L. iners* auf, sowie *L. gasseri*, gefolgt von *L. jensenii*, *L. gallinarum* und *L. vaginalis*. Die Zusammensetzung des vaginalen Ökosystems ist nicht statisch, sondern kann sich mit der Zeit und abhängig von endogenen und exogenen Einflüssen ändern. Beeinflussende Faktoren sind der Zeitpunkt des Menstruationszyklusses, eine Schwangerschaft, die Verwendung von Kontrazeptiva, die Häufigkeit des Geschlechtsverkehrs, variierende Sexualpartner, das Anwenden von Vaginalduschen, die Verwendung von Slipeinlagen oder Vaginaldeos und die Einnahme von Antibiotika oder andern Medikamenten, die das Immunsystem oder Stoffwechselvorgänge beeinflussen.

In Hinblick auf den Menstruationszyklus konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Nicht-Lactobacillus Arten während der Proliferationsphase anstieg, während die Konzentrationen von *Candida albicans* am höchsten nach der Menstruation waren [DONATI et al., 2010].

Frauen, bei denen H_2O_2 produzierende Bakterien in der Vagina vorkommen, haben ein geringeres Risiko an bakterieller Vaginose (BV) zu erkranken. Bakterielle Vaginose ist eine der häufigsten vaginalen Erkrankungen bei Frauen im fruchtbaren Alter. BV ist mikrobiologisch charakterisiert durch die Reduktion oder das Fehlen von Lactobacillen und dem damit verbundenen

Anstieg an anaeroben Gram-negativen Stäbchen, wie beispielsweise *Gardnerella vaginalis* oder *Mobiluncus* Arten an anderen anaeroben Gram-positiven Stäbchen und an *Mycoplasma hominis*. Vielen Frauen fehlen die H₂O₂ produzierenden Lactobacillen auch nach einer Behandlung der BV. In einigen Untersuchungen zeigte sich aber, dass das Einbringen exogener probiotischer Lactobacillus-Stämme helfen konnte die normale vaginale Mikrobiota wieder herzustellen [ANTONIO et al., 2009]. Einige Studien lieferten positive Ergebnisse bei der Behandlung von Patientinnen mit bakterieller Vaginose, nachdem oral die Stämme *L. fermentum* RC-14 und *L. rhamnosus* GR-1 verabreicht worden waren [GIL et al., 2010].

Um eine Aussage über die gesundheitlich wichtige Zusammensetzung der vaginalen Mikrobiota zu treffen, wird der sogenannte Nugent Score verwendet. Hierbei handelt es sich um ein standardisiertes Auswertungssystem nach Nugent et al. (1991). Dabei wird die Vaginalflora als „normal“, „intermediär“ oder „bakterielle Vaginose“ klassifiziert. Diese Einteilung beruht auf einer vorangegangenen Gramfärbung des Vaginalabstrichs [NUGENT et al., 1991; SHIN und KAUL, 2008].

1.3. Probiotika – Verwendung der Lactobacillen als pharmazeutisches Produkt

Bei einem Workshop, der 1995 von der Lactic Acid Bacteria Industrial Platform (LABIP) veranstaltet und von der EU gefördert wurde, wurden Probiotika folgendermaßen definiert: „Orale Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die, nach Aufnahme einer bestimmten Menge, zu einem über die Ernährung hinausgehenden gesundheitlichen Vorteil führen.“ Die Definition von Probiotika der WHO von 2002 lautet folgendermaßen: „Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host“ [WHO, 2002]. In Anlehnung an diese Definition können Probiotika als Nahrungskomponente oder als Nahrungsergänzungsmittel verstanden werden [GUARNER und SCHAAFSMA, 1998].

Die Bezeichnung „Probiotika“ wird manchmal aber auch fälschlicherweise als Synonym für vermeintlich nützliche Bakterien der kommensalen Mikrobiota verwendet.

Von der US Food and Drug Administration (FDA) werden Probiotika, die als Heilmittel in der Humanmedizin eingesetzt werden, auch als „lebende Biotherapeutika“ bezeichnet [SANDERS, 2008].

Es wurde mittlerweile wissenschaftlich und klinisch der Beweis erbracht, dass Probiotika die Darm-Gesundheit verbessern können. Folgende positive Eigenschaften wurden bislang nachgewiesen: Sie verringern und verhindern Diarrhoe, sie sorgen für eine Verbesserung der mikrobiellen Balance im Darm, sie können zu einer Linderung von Lactose-Intoleranz Symptomen führen, sie können Lebensmittel Allergien reduzieren. Weitere potenzielle Verwendungszwecke von Probiotika sind: eine Senkung des Blutdrucks, die Verbesserung des Immunsystems, ein Cholesterinsenkender Effekt und die Unterstützung zur Linderung postmenopausaler Beschwerden. Dabei handelt es sich jedoch um stammspezifische Eigenschaften. D.h., dass nicht jede *Lactobacillus*art dasselbe Ergebnis erzielt.

Einzelne Stämme folgender Arten wurden bislang als Probiotika beschrieben:

L. acidophilus, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum* und *L. reuteri* [LIONG, 2007].

Im Rahmen der Anwendung als Probiotika, gibt es ein wachsendes Interesse an den als Nahrungsmittelzusätzen verwendeten bzw. direkt in Lebensmitteln eingesetzten *Lactobacillen*. Vorallem in Bezug auf ihr Potential das mikrobielle Ökosystem des Gastrointestinaltrakts zu kontrollieren und so die menschliche Gesundheit zu unterstützen. Einige Mechanismen der *Lactobacillen* in Wechselwirkung mit Pathogenen sind beispielsweise kompetitive Exklusion, Immunomodulation, Inhibierung der Virulenz Expression und/oder direktes Abtöten oder Inhibieren durch antimikrobielle Peptide [KLEEREBEZEM et al., 2010].

2. Aufgabenstellung

Lactobacillen besiedeln den menschlichen Körper in großen Mengen und tragen so auch zur Gesundheit bei. Sie können beispielsweise die Ausbreitung und Besiedelung von schädigenden Mikroorganismen verhindern.

Besonders in der vaginalen Mikrobiota spielen Lactobacillen eine wichtige Rolle. So kann eine Minimierung der vaginalen Lactobacillen bakterielle Vaginose zur Folge haben. Gerade mit zunehmendem Alter erhöht sich dieses Risiko, da der Östrogenspiegel sinkt und dadurch die Lactobacillen Keimzahl sinken kann. Deshalb ist es für die medizinische Forschung von Bedeutung, neue Wege zu finden, diese Reduzierung zu minimieren bzw. auszugleichen. Oral verabreichte Probiotika stellen hier möglicherweise eine sehr gut akzeptierte Verabreichungsform dar.

Um eine optimale Behandlung zu entwickeln, d.h. vor allem physiologische Lactobacillusarten auszuwählen, ist es unumgänglich die Lactobacillenmikrobiota im Habitat „Mensch“ genauer zu erfassen.

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde das Auftreten von Lactobacillen bei 30 gesunden postmenopausalen Frauen untersucht. Bei den zu untersuchenden Proben handelte es sich um Abstriche aus Mund, Rektum und Vagina. Diese wurden mit zwei unterschiedlichen Technologien näher untersucht. Zum einen wurden, nach vorangegangener Keimzahlbestimmung, Einzelkolonien kultiviert, welche dann mittels Gattungs-spezifischer und nachfolgender Art-spezifischer Multiplex-PCR identifiziert werden konnten. Die andere Untersuchungsmethode bestand aus einer PCR-DGGE mit anschließender Sequenzierung ausgewählter Einzelbanden.

Ein weiteres Ziel dieser Diplomarbeit war der Vergleich der Lactobacillenmikrobiota postmenopausaler Frauen, mit jener von Schwangeren. Dabei sollten allfällige Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiota, sowie das Dominieren einzelner Arten aufgezeigt werden.

Als Grundlage für diesen Vergleich, diente eine vorausgegangene Diplomarbeit (Kronendorfer, 2008), in der die Lactobacillenmikrobiota von Schwangeren mit demselben Methodenspektrum untersucht wurde.

3. Material und Methoden

Nach dem Erhalt der in Amies Transportmedium transportierten Abstriche von 30 postmenopausalen Frauen vom AKH Wien, Universitätsklinik für Frauenheilkunde, Abteilung für Geburtshilfe und feto-maternale Medizin, wurden diese auf 4°C gekühlt und möglichst rasch untersucht. Es wurden jeweils zeitgleich 2 Abstriche aus der Mundhöhle, der Vagina und dem Rektum jeder Frau genommen. Abstrich 1 wurde zunächst mit kultureller Methodik untersucht. Anschließend wurde auf molekularbiologischer Ebene weitergearbeitet. Bei Abstrich 2 wurden sofort molekularbiologischen Methoden angewandt.

Folgende Codierung wurde verwendet:

P31-P60: Nummer der Probandinnen

M1, V1, R1 oder M2, V2, R2: Abstrich 1 Mund, Abstrich 1 Vagina und Abstrich 1 Rektum; die gleiche Bezeichnung wurde für Abstrich 2 verwendet (beide Abstriche wurden zeitgleich genommen)

3.1. Mikrobiologische Methoden

3.1.1. Einleitung

Das Ziel dieser Arbeitsschritte war es, reine Einzelkulturen zu erhalten und daraus die Keimzahl für Abstrich 1 zu ermitteln. Dafür wurden die Proben zuerst mittels einer Variante des Koch'schen Plattenverfahrens, des Oberflächenspatelverfahrens, auf MRS-Agar Platten gebracht, um so eine semiquantitative Keimzahlbestimmung vornehmen zu können.

Beim Koch'schen Plattenverfahren (Koch 1881) handelt es sich um eine der zuverlässigsten Keimzählmethoden, bei der man große Genauigkeit erlangt.

Der Vorteil des Oberflächenspatelverfahrens im Vergleich zum Plattengussverfahren, liegt darin, dass die Gefahr einer Hitzeschädigung vermieden wird und die Kolonien außerdem direkt auf der Agaroberfläche zugänglich sind [PICHHARDT, 1998].

Anschließend wurden die erhaltenen Kolonien mittels fraktioniertem Ausstrich so lange weiterüberimpft, bis es makroskopisch sowie mikroskopisch zu reinen Einzelkolonien kam. Handelte es sich um eine Reinkultur, wurde diese weiter angezüchtet, die Zellen anschließend geerntet und mit dem erhaltenen Zellmaterial auf molekularbiologischer Ebene weitergearbeitet.
[KRONDORFER, 2008]

3.1.2. Herstellung der Nährmedien

MRS-Agar

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Art. Nr. 1.10660

Zusammensetzung:

- 10 g Pepton aus Casein
- 10 g Fleischextrakt
- 4 g Hefeextrakt
- 20 g D(+)-Glucose
- 2 g di-Kaliumhydrogenphosphat
- 1 g TWEEN 80
- 2 g di-Ammoniumhydrogencitrat
- 5 g Natriumacetat
- 0,2 g Magnesiumsulfat
- 0,04 g Mangansulfat
- 14 g Agar
- pH = 5,7 +/- 0,2

Geräte und Reagentien

- Autoklav CertoClav, CertoClav Sterilizer GmbH
- Glasflaschen, Schott AG
- Messzylinder
- Plastik-Petrischalen, steril, Schale 94,16, Greiner Bio-One GmbH
- Wasserbad D8, Haake
- Waage PG5002-S Delta Range, Mettler Toledo GmbH
- Mikrowelle, Whirlpool

Durchführung

68,2 g des Trockenmediums wurden in 1000 ml destilliertem Wasser suspendiert und durch Erhitzen in der Mikrowelle aufgeschmolzen. Das Medium wurde bei 121°C für 15 min autoklaviert und nach dem Abkühlen im Wasserbad auf ca. 50°C wurden Platten gegossen.

MRS-Bouillon

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Art. Nr. 1.10661

Zusammensetzung:

- 10 g Pepton aus Casein
- 8 g Fleischextrakt
- 4 g Hefeextrakt
- 20 g D(+)-Glucose
- 2 g di-Kaliumhydrogenphosphat
- 1 g TWEEN 80
- 2 g di-Ammoniumhydrogencitrat
- 5 g Natriumacetat
- 0,2 g Magnesiumsulfat
- 0,04 g Mangansulfat
- pH = 5,7 +/- 0,2

Zusätzlich wurden 0,5 g/l Cysteinhydrochlorid zugesetzt. Cysteinhydrochlorid wirkt reduzierend. Das fördert das Wachstum von Anaerobiern.

Geräte und Reagentien

- L-Cystein-Hydrochlorid-Hydrat 99%, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
- Autoklav CertoClav, CertoClav Sterilizer GmbH
- Plastik-Petrischalen, steril, Schale 94,16, Greiner Bio-One GmbH
- Wasserbad D8, Haake
- Mikrowelle, Whirlpool
- Glasflaschen, Schott AG
- Messzylinder
- Eprouvetten, Schott AG
- Dispenser 2 – 10 ml Ceramus, Fa. Hirschmann

Durchführung

52,2 g des Trockenmediums und 0,5 g Cysteinhydrochlorid wurden mit 1000 ml destilliertem Wasser gemischt, durch kräftiges Schütteln suspendiert und mit Hilfe eines Dispensers auf Eprouvetten aufgeteilt. Diese wurden, nachdem sie mit Metallkappen verschlossen wurden, für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

[KRONDORFER, 2008]

3.1.3. Semiquantitative Keimzahlbestimmung

Um die Keimzahl der Swabs semiquantitativ bestimmen zu können, wurden insgesamt 4 dezimale Verdünnungen hergestellt und diese mittels Spateltechnik auf MRS-Agar-Platten ausgestrichen.

Nährmedien

- MRS-Agar, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Art. Nr. 1.10660

Geräte und Reagentien

- Kolbenhubpipetten, Fa. GILSON
- Eppendorf-Gefäße, Eppendorf AG
- Sterile Einwegspatel, Greiner Bio-One GmbH
- Anaerobierschränke: WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland und Fa. SCHOLZEN, Kriens, Schweiz
- PBS-Lösung (1 Liter):
 - 8 g NaCl
 - 0,2 g KCL
 - 1,15 g Dinatriumhydrogenphosphat
 - 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat
 - pH 7,3

Durchführung

Jeder Swab wurde für 1 min in 1 ml PBS hin- und herbewegt, um anhaftendes Material zu suspendieren. Danach wurde kurz gemischt und 100µl dieser Suspension in ein weiteres Reaktionsgefäß pipettiert, welches 900µl PBS enthielt. Das ganze wurde noch zweimal wiederholt, bis insgesamt 4 Verdünnungsstufen vorlagen. Von den Verdünnungsstufen wurden nun jeweils 100µl auf eine vorbereitete MRS-Agar-Platte pipettiert und mittels Einwegspateln verteilt. Die Platten wurden dann 48 h bei 37 °C anaerob bebrütet und anschließend ausgezählt.

[KRONDORFER, 2008]

3.1.4. Subkultivierung von Einzelkolonien

Zur Reinzucht wurden unterschiedliche Kolonieförmungen ausgewählt und mittels fraktioniertem Ausstrich so lange weiterüberimpft, bis sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch (Nachweis mittels Methylenblaufärbung) eine Reinkultur vorlag.

Geräte und Reagentien

- MRS-Agar, Merck KGaA, Darmstadt.
- Sterile Einweg-Impfösen, Greiner Bio-One GmbH
- Mikroskop, Olympus GmbH
- Anaerobierschränke: WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland und Fa. SCHOLZEN, Kriens, Schweiz
- Immersionsöl
- Physiologische NaCl-Lösung
- Methylenblau-Lösung, bioMerieux

Durchführung

Mittels fraktioniertem Ausstrich wurden alle makroskopisch unterschiedlichen Kolonieformen von der MRS-Agar-Platte, die im auszählbaren Bereich lag (30 – 300 KBE), auf neue MRS-Platten überimpft. Die Platten wurden bei 37°C für 48 h anaerob bebrütet. Dies wurde so oft wiederholt, bis eine Reinkultur vorlag. Wenn nun makroskopisch eine Reinkultur vorlag, wurde untersucht, ob auch mikroskopisch eine Reinkultur vorliegt. Dazu wurde eine Kolonie in einem Tropfen physiologischer NaCl-Lösung auf einem Objektträger suspendiert, hitzefixiert, mit Methylenblau gefärbt und unter Ölimmersion (bei 100facher Vergrößerung) mikroskopiert. Präparate, bei denen es sich offensichtlich nicht um Lactobacillen handelte, wie z. B. Hefen, wurden nicht weiter bearbeitet.

[KRONDORFER, 2008]

3.1.5. Zellernte

Eine Kolonie der Reinkultur wurde in MRS-Bouillon versetzt mit 0,5 g/l Cysteinhydrochlorid angezüchtet, abzentrifugiert und das Pellet zuerst mit physiologischer NaCl-Lösung und anschließend EDTA gewaschen. Ein Teil der Kultur in MRS-Bouillon wurde mit Glycerin versetzt und bei -80 °C aufbewahrt.

Geräte und Reagentien

- Kolbenhubpipetten, Fa. GILSON
- Anaerobierschränke: WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland und Fa. SCHOLZEN, Kriens, Schweiz
- Centrifuge 5415R, Eppendorf AG
- Kühlschrank -20 °C, Elektra Bregenz AG
- MRS-Bouillon in Epprouvetten
- L-Cystein-Hydrochlorid-Hydrat 99%, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
- Sterile Einweg-Impfösen, Greiner Bio-One GmbH
- Eppendorf Gefäße, Eppendorf AG
- Cryovials 2,0 ml freistehend, Art. Nr. 710513, Simport Ltd., Canada
- Glycerin 86 %, Roth GmbH & Co. KG, Nr. 7533.1
- 0,9 % NaCl Lösung
- EDTA 50 mM, pH 8

Durchführung

Mit einer sterilen Einweg-Impföse wurde eine Kolonie der Reinzuchtplatte entnommen, in 5 ml MRS-Bouillon überführt und anschließend wurden die Epprouvetten bei 37 °C für 24 h anaerob bebrütet. Danach wurden die Epprouvetten mit Bakterienwachstum gemischt und 1,5 ml der Bakteriensuspension in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Weitere 1,5 ml wurden in einem Cryovial mit 300 µl Glycerin versetzt, gemischt und danach bei -80 °C tiefgefroren. Die 1,5 ml im Reaktionsgefäß wurden bei 8000 min⁻¹ und 4 °C für 6 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann zuerst mit 900 µl 0,9 % NaCl-Lösung und anschließend mit 900 µl EDTA (50 mM, pH 8) gewaschen, unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Die so gewonnene Biomasse (das gewaschene Pellet) wurde bei -20 °C tiefgefroren.

[KRONDORFER, 2008]

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Einleitung

Nachdem die DNA isoliert wurde, umfassten die weiteren molekularbiologischen Arbeitsschritte auf der einen Seite die Durchführung verschiedener PCR-Reaktionen, gefolgt von einer Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung des Ergebnisses. Die zweite Art, mit welcher die DNA der direkt isolierten Proben näher untersucht wurde, war die PCR-DGGE.

[KRONDORFER, 2008]

3.2.2. DNA-Isolierung

Für die Isolierung der DNA wurde der ArchivePure DNA Yeast and Gram-positive Kit von 5PRIME verwendet. Sowohl die DNA der mikrobiologisch erhaltenen Reinkulturen als auch die DNA von Swab 2 wurde mit diesem Kit isoliert. Die Swabs 2 wurden dazu zuvor in 1 ml PBS hin- und herbewegt, um eine Suspendierung der anhaftenden Substanz zu gewährleisten. Anschließend wurde bei 12000 min^{-1} für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Inhalt

- Cell Suspension Solution
- Lytic Enzyme Solution
- Cell Lysis Solution
- RNase A Solution
- Protein Precipitation Solution
- DNA Hydration Solution

Geräte und Reagentien

- Centrifuge 5415R, Eppendorf AG
- Vortex MS 2 Minishaker, IKA GmbH & Co. KG
- Heizblock QBD4, Grant Ltd., UK
- Kühlschrank 4 °C, Electrolux GmbH
- Kühlschrank -20 °C, Elektra Bregenz AG
- Kolbenhubpipetten Pipetman, Fa. GILSON
- Pipettenspitzen, Biozym GmbH
- Isopropanol, Roth GmbH & Co. KG
- 70 % Ethanol, Roth GmbH & Co. KG

Durchführung

Zum Pellet wurden 300 µl Cell Suspension Solution gegeben und auf- und abpipettiert, bis die Zellen suspendiert waren. 1,5 µl Lytic Enzyme Solution wurden hinzugefügt und durch 25-maliges invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Die Suspension wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert, um die Zellwand abzubauen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 12000 min⁻¹ für 1 min, um die Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde abgezogen und verworfen. Dem Pellet wurden nun 300 µl Cell Lysis Solution zugegeben und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren suspendiert. Zum Lysat wurden noch 1,5 µl RNase A Solution hinzugefügt, wieder durch 25-maliges Invertieren gemischt und bei 37 °C für 15 – 60 min inkubiert. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt, indem sie anschließend für kurze Zeit bei 4 °C inkubiert wurden. Dann wurden 100 µl Protein Precipitation Solution dem Zell-Lysat zugegeben und 20 s bei höchster Geschwindigkeit gemischt. Anschließend wurden die Proben bei 12000 min⁻¹ für 3 min zentrifugiert; präzipitiertes Protein wird dabei als weißes Pellet sichtbar. Der DNA enthaltende Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, in dem schon 300 µl Isopropanol vorgelegt wurden. Die Proben wurden durch 50-maliges invertieren vermischt und dann für 1 min bei 12000 min⁻¹ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Reaktionsgefäß auf sauberem Papier getrocknet. Um das Pellet zu waschen wurden nun 300 µl 70 %iges Ethanol zugegeben und das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert. Es wurde wieder für 1 min bei 12000 min⁻¹ zentrifugiert, der Überstand abermals

verworfen, nochmals auf sauberem Papier getrocknet und anschließend für weitere 10-15 min luftgetrocknet. Zuletzt wurden 100 µl DNA Hydration Solution zugefügt, kurz gemischt und anschließend für 1 h bei 65 °C inkubiert. Um die DNA zu rehydrieren wurden die Proben über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde die isolierte DNA bei -20°C tiefgefroren.

[KRONDORFER, 2008]

3.2.3. PCR – Polymerase Chain Reaction

Die Polymerase- Kettenreaktion (PCR) wurde 1985 von Kary Mulis entwickelt und ist eine *in vitro* Methode zur DNA Synthese. Durch diese wichtige Errungenschaft der Molekularbiologie ist es möglich bestimmte DNA-Abschnitte innerhalb weniger Stunden millionenfach zu vervielfältigen [BARKER, 2006].

Durch die Entdeckung der hitzestabilen DNA-Polymerase, der sogenannten Taq Polymerase, isoliert aus *Thermus aquaticus*, konnte der Vorgang enorm vereinfacht werden, da die Amplifikations-Reaktion nun auch bei höheren Temperaturen durchgeführt werden konnte. [SAIKI et.al, 1988]

Abbildung 3-1 zeigt schematisch den Ablauf einer PCR. Die doppelsträngige DNA α mit der Zielsequenz wird unter Einwirkung von Hitze in Einzelstränge aufgeschmolzen. Durch Absenken der Temperatur hybridisieren die Primer mit den zu ihnen komplementären Abschnitten. Die Primer werden anschließend bei einer Temperatur zwischen 65–72 °C bei der durch die thermostabile DNA-Polymerase katalysierten Polymerisationsreaktion verlängert und es entstehen wieder doppelsträngige Produkte [WILHELM, 2005].

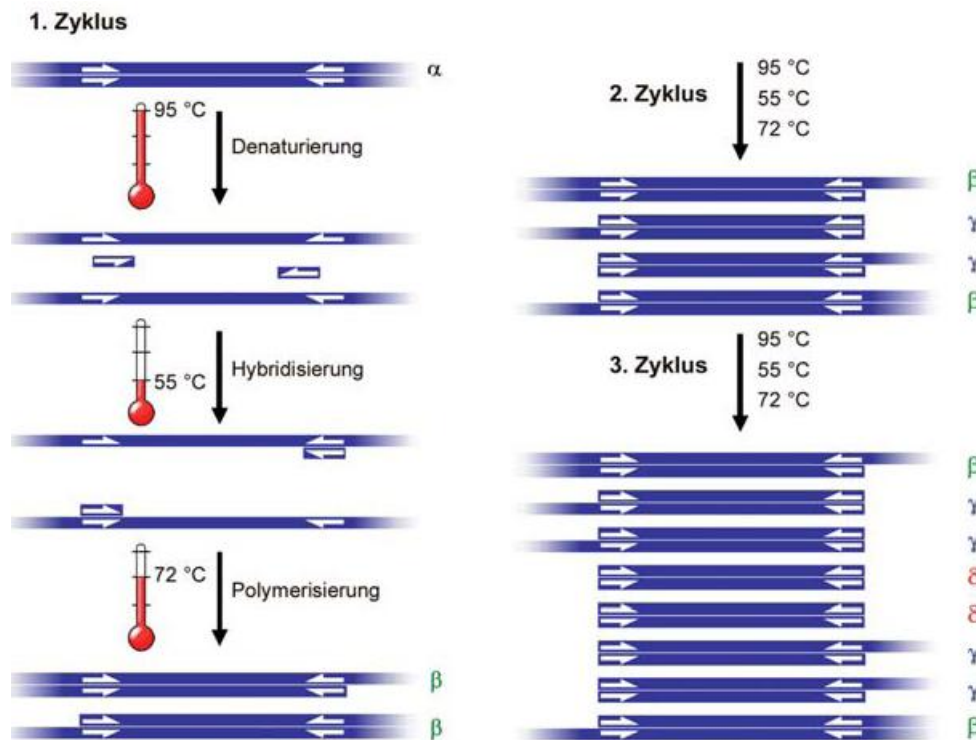


Abb. 3-1.: Prinzip der Polymerase Kettenreaktion [WILHELM, 2005]

Gattungsspezifische PCR

Mittels Gattungsspezifischer PCR kann bestätigt werden, dass es sich bei den kultivierten Isolaten um Bakterien der Gattung *Lactobacillus* handelt. Dazu wurde die isolierte DNA der Reinkulturen mit *Lactobacillus*-spezifischen Primern amplifiziert: Lac1-f und Lac2-r. [WALTER et al., 2001]

Multiplex-PCR

Die Isolate, welche zuvor durch die Gattungsspezifische PCR als Lactobacillen identifiziert wurden, wurden nun mit Hilfe der folgenden Multiplex-PCR in 4 *Lactobacillus*-Gruppen eingeteilt. Dazu wurden die Primer Ldel-7, LU-5', LU-3', LU-1' als Forward Primer und der Primer Lac-2 als Backward Primer [SONG et al., 2000] verwendet.

Art-spezifische Multiplex-PCR

Nachdem die Einteilung der *Lactobacillus*-Isolate in Gruppen vorgenommen wurde, konnte nun noch eine genauere Strukturierung innerhalb der Gruppen auf Artebene vorgenommen werden. Dazu wurden Art-spezifische Primer kombiniert eingesetzt, wie in den Tabellen 3-6 – 3-15 ersichtlich ist.

PCR für DGGE

Diese PCR wurde genauso durchgeführt wie die Gattungs-spezifische PCR, nur wurde hierfür ein Backward Primer mit GC-Klammer verwendet, eine GC-Sequenz, die ca. 20 Basen lang ist.

Geräte

- Thermocycler „Mastercycler gradient“, Eppendorf AG
- Thermocycler „Mastercycler“, Eppendorf AG
- Centrifuge 5415R, Eppendorf AG
- Vortex MS 2 Minishaker, IKA GmbH & Co. KG
- Kühlschrank 4 °C, Electrolux GmbH
- Kühlschrank -20 °C, Elektra Bregenz AG
- Kolbenhubpipetten, Fa. GILSON
- Pipettenspitzen, Biozym GmbH
- Sterile Eppendorf-Gefäße, Eppendorf AG
- Latexhandschuhe, VWR International GmbH
- Pinzette

Reagentien

- 10x PCR-Buffer (Dynazyme) F-511, MWG-Biotech AG
- Dynazyme II DNA Polymerase F-501L, 2 U/μl, Finnzymes Oy, Espoo, Finland
- dATP-Solution, 100 mM A2079, AppliChem GmbH
- dCTP-Solution, 100 mM A2080, AppliChem GmbH
- dGTP- Solution, 100 mM A2081, AppliChem GmbH
- dTTP- Solution, 100 mM A2082, AppliChem GmbH
- Primer, Eurofins MWG/Operon

Lösungen

Mastermix M (MS)

7500 µl steriles UHQ-Wasser

1000 µl 10x PCR-Puffer

200 µl dNTP-Mix

100 µl Dynazyme (2U/µl)

Mischen, in Aliquote von 1 ml abfüllen, bei - 20°C lagern.

dNTP-Mix

100 µl ATP, 100 mM

100 µl CTP, 100 mM

100 µl GTP, 100 mM

100 µl TTP, 100 mM

600 µl steriles UHQ-Wasser

Primer-Lösung (10 pmol/µl)

10 µl Primer Stocklösung (100 pmol/µl)

90 µl steriles UHQ-Wasser

Durchführung

In einem gekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde zunächst ein Premix vorbereitet: Für jede Probe wurden 22,5 µl des Mastermix (MS) und 1 µl jedes Primers benötigt. Da mögliche Pipettierfehler berücksichtigt werden mussten, wurde der Premix immer für eine Probe mehr kalkuliert. Der Premix wurde kurz gemischt und 24,5 µl pro Probe in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde 1 µl der Proben-DNA dazupipettiert und auf kleiner Stufe gemischt, um die DNA nicht zu schädigen. Die Ansätze wurden kurz abzentrifugiert, in den Thermocycler gestellt und die gewünschten Bedingungen eingegeben.

Zur Überprüfung jeder PCR wurde immer eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle – bestehend aus dem PCR-Ansatz ohne DNA - mitgeführt.

In den folgenden Tabellen findet sich ein Überblick über die Sequenzen der verwendeten Primer für die Gattungs-spezifische, Multiplex- und Art-spezifische PCR, sowie die genauen Cycler-Programme.

Tab. 3-1: Sequenzen der verwendeten Primer [WALTER et al., 2001]

Primer	Basensequenz 5' – 3'	bp	Annealing-Temperatur
Lac1-f	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	380 bp	61 °C
Lac2-r	ATT(CT)CACCGCTACACATG		

Tab. 3-2: PCR-Programme der verwendeten Primer, 30 Zyklen [WALTER et al., 2001]

Schritt	Lac1-f, Lac2-r
Initiale Denaturierung	95 °C, 4 min
Denaturierung	95 °C, 30 s
Annealing	61 °C, 40 s
Elongation	72 °C, 1 min
Finale Elongation	72 °C, 5 min

Tab. 3-3: Sequenzen der Multiplex-Primer [SONG et al., 2000]

Primer	Sequenz 5' – 3'	bp	Annealing-Temperatur
Ldel-7	ACAGATGGATGGAGAGCAGA	450 bp	60 °C
LU-5'	CTAGCGGGTGCGACTTTGTT	400 bp	
LU-3'	AAACCGAGAACACCGCGTT	350 bp	
LU-1'	ATTGTAGAGCGACCGAGAAG	300 bp	
Lac-2	CCTCTTCGCTCGCCGCTACT	Backward Primer	

Die Primer für die Multiplex-PCR wurden nicht auf 10pM, sondern auf 20pM verdünnt und davon jeweils 0,5 µl eingesetzt. Auch hier wurde wieder 1 µl Template-DNA verwendet. Folgendes Programm wurde am Thermocycler eingestellt:

Tab. 3-4: Temperaturabfolge der Multiplex-PCR, 35 Zyklen [SONG et al., 2000]

Schritt	Multiplex-PCR
Initiale Denaturierung	94 °C, 4 min
Denaturierung	94 °C, 1 min
Annealing	60 °C, 1 min
Elongation	72 °C, 1 min
Finale Elongation	72 °C, 8 min

Nachdem die Isolate durch die Gattungs-spezifische PCR als *Lactobacillus*-positiv eingestuft wurden, konnten sie nun durch den Einsatz der Multiplex-PCR in spezifische Gruppen eingeteilt werden (siehe Tabelle 3-5). Die unterschiedliche Bandenlänge der Proben am Agarosegel gibt Aufschluss über die Zugehörigkeit der Isolate zu den jeweiligen Gruppen (siehe Tabelle 3-3). [KRONDORFER, 2008]

Tab. 3-5: Einteilung der Lactobacillen in Gruppen, [SONG et al., 2000]

Gruppe I Primer Ldel-7 Positivkontrolle: Lb 27: <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> DSM 20074 ATCC 9649	Gruppe II Primer LU-1' Positivkontrolle: Lb 3: <i>L. gasseri</i> DSM 20243 ATCC 33323	Gruppe III Primer LU-5' Positivkontrolle: Lb 9: <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> DSM 5622	Gruppe IV Primer LU-3' Positivkontrolle: Lb 13: <i>L. reuteri</i> DSM 20016 ATCC 23272
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>L. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>L. amylovorus</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. salivarius</i> ssp. <i>salicinius</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. zeae</i>	<i>L. curvatus</i>
	<i>L. crispatus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. reuteri</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. gasseri</i>		<i>L. plantarum</i>
	<i>L. jensenii</i>		<i>L. plantarum</i>

Gruppe II:

Tab. 3-6: Primer für *Lactobacillus jensenii*. Positivkontrolle: DSM 20557, ATCC 25258

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Literatur	bp	Annealing-Temperatur
Ljen-3	AAGAAGGCACTGAGTACGGA	SONG et al., 2000	210	68 °C
23-10C	CCTTTCCTCACGGTACTG			

Tab. 3-7: Primer für *Lactobacillus acidophilus*. Positivkontrolle: DSM 20079, ATCC 4356

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Literatur	bp	Annealing-Temperatur
Laci-1	TGCAAAGTGGTAGCGTAAGC	SONG et al., 2000	700	68 °C
23-10C	CCTTTCCTCACGGTACTG			

Tab. 3-8: Primer für *Lactobacillus crispatus*. Positivkontrolle: DSM 20584, ATCC 33820

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Literatur	bp	Annealing-Temperatur
Lcri-3	AGGATATGGAGAGCAGGAAT	SONG et al., 2000	522	65 °C
Lcri-2	CAACTATCTCTTACACTGCC			

Tab. 3-9: Primer für *Lactobacillus gasseri*. Positivkontrolle: DSM 20243, ATCC 33323

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Literatur	bp	Annealing-Temperatur
Lgas-3	AGCGACCGAGAAGAGAGAGA	SONG et al., 2000	360	65 °C
Lgas-2	TGCTATCGCTTCAAGTGCTT			

Gruppe III:

Tab. 3-10: Primer für *Lactobacillus paracasei*. Positivkontrolle: DSM 5622

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Literatur	bp	Annealing-Temperatur
LU-5'	CTAGCGGGTGCGACTTTGTT	Song et al., 2000	312	60 °C
Lpar-4	GGCCAGCTATGTATTCACTGA			

Tab. 3-11: Primer für *Lactobacillus rhamnosus*. Positivkontrolle: LMG 6400

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Literatur	bp	Annealing-Temperatur
LU-5'	CTAGCGGGTGCGACTTTGTT	Song et al., 2000	113	60 °C
Rhall	GCGATGCGAATTTCTATTATT			

Gruppe IV:

Tab. 3-12: Primer für *Lactobacillus salivarius*. Positivkontrolle: DSM 20555, ATCC 11741, NCDO 929

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Literatur	bp	Annealing-Temperatur
Lsal-1	AATCGCTAAACTCATAACCT	Song et al., 2000	411	55 °C
Lsal-2	CACTCTCTTTGGCTAATCTT			

Tab. 3-13: Primer für *Lactobacillus reuteri*. Positivkontrolle: DSM 20016, ATCC 23272

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Literatur	bp	Annealing-Temperatur
Lreu-1	CAGACAATCTTTGATTGTTTAG	Song et al., 2000	303	55 °C
Lreu-4	GCTTGTTGGTTTGGGCTCTTC			

Tab. 3-14: Primer für *Lactobacillus plantarum*. Positivkontrolle: DSM 20174, ATCC 14917

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Literatur	bp	Annealing-Temperatur
Lpla-3	ATTCATAGTCTAGTTGGAGGT	Song et al., 2000	248	55 °C
Lpla-2	CCTGAACTGAGAGAATTTGA			

Tab. 3-15: Primer für *Lactobacillus fermentum*. Positivkontrolle: DSM 20052, ATCC 14931, NCDO 1750

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Literatur	bp	Annealing-Temperatur
Lfer-3	ACTAACTTGACTGATCTACGA	Song et al., 2000	192	55 °C
Lfer-4	TTCACTGCTCAAGTAATCATC			

Gattungsspezifische Enterococcen-PCR:

Tab. 3-16: Primer für *Enterococcus* spp. Positivkontrolle: DSM 2918

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Literatur	bp	Annealing-Temperatur
Espp-1	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	Rinttilä et al., 2004	144	61 °C
Espp-2	ACTCGTTGTAAGTCCCATTTGT			

Tab. 3-17: PCR-Programme der verwendeten Primer, 35 Zyklen [RINTTILÄ et al., 2004]

Schritt	Espp-1, Espp-2
Initiale Denaturierung	95 °C, 5 min
Denaturierung	95 °C, 15 s
Annealing	61 °C, 20 s
Elongation	72 °C, 30 s
Finale Elongation	72 °C, 5 min

Tab. 3-18: Primer für *E. faecalis* und *E. faecium* Multiplex-PCR. Positivkontrolle: DSM 20478, ATCC 19433, DSM 2918

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Literatur	bp	Annealing-Temperatur
DUT-E1	ATCAAGTACAGTTAGTCTT	Dutka- Malen et al., 1995	941	54 °C
DUT-E2	ACGATTCAAAGCTAACTG			
DUT-F1	GCAAGGCTTCTTAGAGA		550	
DUT-F2	CATCGTGTAAGCTAACTTC			

Tab. 3-19: PCR-Programme der verwendeten Primer, 30 Zyklen [DUTKA-MALEN et al., 2004]

Schritt	Espp-1, Espp-2
Initiale Denaturierung	94 °C, 2 min
Denaturierung	94 °C, 1 min
Annealing	54 °C, 1 min
Elongation	72 °C, 1 min
Finale Elongation	72 °C, 10 min

3.2.4. Agarose Gelelektrophorese

Bei der Elektrophorese handelt es sich um die Trennung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. „Durch Elektrophorese werden Moleküle in einer Mischung anhand ihrer Größe, Form oder Ladung getrennt.“ [BARKER, 2006]

Folgender Marker wird bei allen Agarosegelen verwendet:

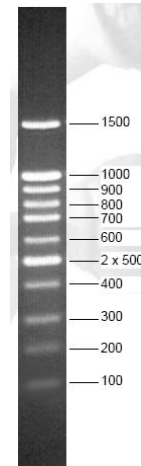


Abb. 3-2: 100 bp-DNA-Marker DNA ladder 100 bp plus (AppliChem GmbH)

Geräte

- Elektrophorese Apparatur ComPhor (MINI, MIDI oder MAXI), Gelträger und Kämme, BIOplastics BV, Niederlande
- Power Supply E835, 300 V – 500 mA, Consort NV, Belgien
- Kühlung F6, Haake GmbH
- SEA2000, Submerged Gel Electrophoresis Apparatus, Elchrom Scientific, Switzerland
- ORIGINS by Elchrom Scientific, Switzerland
- Centrifuge 5415R, Eppendorf AG
- Vortex MS 2 Minishaker, IKA GmbH & Co. KG
- Mikrowelle Easytronic, Fa. Whirlpool
- Kolbenhubpipetten, Fa. GILSON
- Pipettenspitzen, Biozym GmbH
- Sterile Eppendorf-Gefäße, Eppendorf AG
- Latexhandschuhe, VWR International GmbH
- Sterile Glasflaschen, Schott AG
- Löffel

-
- Waage 1207 MP, Sartorius AG
 - Messzylinder, Schott AG
 - Sterile Spritze Norm-Ject, 10 ml
 - Chemilmager 5500, Alpha Innotech Ltd., San Leandro, CA, USA
 - Färbe- und Entfärbewanne

Reagentien

- Agarose (für Gelelektrophorese) SeaKem LE Agarose 50002, Cambrex Corp., USA
- 100 bp-DNA-Marker DNA ladder 100 bp plus A5216, AppliChem GmbH
- Borsäure A2940, AppliChem GmbH
- Bromphenolblau A4968, AppliChem GmbH
- Xylencyanol FF A4976, AppliChem GmbH
- EDTA-Lösung 0,5 M, pH 8 A3145, AppliChem GmbH
- Ficoll A2252, AppliChem GmbH
- Tris UltraPure A1086, AppliChem GmbH
- Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml), Art. Nr. 2218.2, Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Lösungen

5x TBE-Puffer

54 g Tris

27,5 g Borsäure

20,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8)

In 1 Liter UHQ-Wasser lösen, autoklavieren (121 °C, 15 min).

0,5x TBE-Puffer

100 ml 5x TBE-Puffer

900 ml UHQ-Wasser

50x TAE-Puffer

242 g Tris

57,5 ml „Eisessig“

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8)

Auf 1000 ml mit UHQ-Wasser auffüllen, autoklavieren (121 °C, 15 min).

0,75x TAE-Puffer

15 ml 50x TAE-Puffer

985 ml UHQ-Wasser

6x Gelladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 13% Ficoll)

0,025 g Bromphenolblau

0,025 g Xylene Cyanol

1,500 g Ficoll

Mit 10 ml autoklaviertem UHQ-Wasser versetzen, bei Raumtemperatur lagern.

100 bp-DNA-Marker (0,083 µg/µl)

50,0 µl Stock-Lösung mit

450,0 µl sterilem UHQ-Wasser mischen,

100,0 µl 6 x Gelladepuffer zugeben, vortexen.

Färbelösung

35 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

350 ml destilliertes Wasser

Herstellung des Agarosegels

Die benötigte Menge Agarose (SEA2000/ORIGINS, MINI, MIDI oder MAXI-Gel, siehe Tab. 3-20) wurde steril in eine zuvor autoklavierte Glasflasche eingewogen und die entsprechende Menge an 0,5x TBE bzw. 0,75x TAE dazugegeben.

Tab. 3-20: Einwaage Agarosegel für ein 2 %iges Gel

Gelgröße/Apparatur	Agarose [g]	0,5 x TBE bzw. 0,75x TAE [ml]	Verwendeter Puffer
SEA2000/ORIGINS	1,4	70	0,75x TAE
MINI	0,6	30	0,5x TBE
MIDI	1,8	90	0,5x TBE
MAXI	4	200	0,5x TBE

Die Agarose wurde in der Mikrowelle aufgeschmolzen, zwischendurch wurde die Glasflasche geschwenkt, so lange, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Anschließend wurde die Agarose im Wasserbad 15 min auf 50 °C temperiert.

ComPhor: Das Gel wurde in den waagrecht ausgerichteten Gelträger gegossen, der Kamm eingesetzt, die Kühlung eingeschaltet und für eine Stunde polymerisiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Gelträger gedreht, fixiert, der Kamm entfernt und die benötigte Menge 0,5x TBE in die Apparatur gegossen, so dass das Gel bedeckt war.

SEA2000/Origins: Das Gel wurde in den waagrecht ausgerichteten Gelträger gegossen, der Kamm eingesetzt und bei Raumtemperatur zwischen 45 - 60 min polymerisiert. Gleichzeitig wurde der Laufpuffer in der Apparatur vorbereitet und die Kühlung, sowie die Pumpe eingeschaltet. Nach Ablauf dieser Zeit, wurde der Gelträger in die Apparatur gegeben, der Kamm entfernt und für die Dauer des Befüllens die Pumpe ausgeschaltet.

Tab. 3-21: Menge an Laufpuffer nach Gelgröße

Gelgröße/Apparatur	Laufpuffer 0,5x TBE bzw. 0,75x TAE [ml]
SEA2000/ORIGINS	2000
MINI	350
MIDI	800
MAXI	1500

Elektrophorese

1 Teil des Ladepuffers wurde mit 4 Teilen des PCR-Produkts in 0,5 ml Reaktionsgefäßen pipettiert und kurz abzentrifugiert. Danach wurden 6 µl der Proben und 4 µl vom Marker in die Geltaschen pipettiert. Der Deckel der Elektrophoresekammer wurde geschlossen, die Kabel an die Stromversorgung angesteckt und die gewünschte Spannung eingestellt (siehe Tabelle 3-22). Der Lauf wurde gestartet. Die Laufzeit beträgt je nach Gel zwischen 45 min (MINI) und 1,5 Stunden (SEA2000/ORIGINS, MIDI, MAXI).

Tab. 3-22: Spannungswerte Elektrophorese

Gelgröße	Spannung [V]
SEA2000/ORIGINS	80
MINI	80
MIDI	130
MAXI	210

Färben des Gels

Ethidiumbromid (EtBr) wirkt sowohl kanzerogen, als auch mutagen und wird als sehr giftiger Gefahrenstoff eingestuft (Gefahrensätze: R22-26-68), deswegen wird jeder Arbeitsschritt mit EtBr im Ethidiumbromid-Raum mit Nitrilhandschuhen durchgeführt, um eine Kontamination der anderen Laborräume zu vermeiden.

Nachdem der Lauf in der Elektrophoresekammer beendet war, wurde das Gel vom Gelträger gelöst und in 700 ml bzw. 350 ml (für MIDI oder MINI-Gel, sowie SEA2000/ORIGINS) destilliertem Wasser, dem 70 µl bzw. 35 µl Ethidiumbromid zugefügt wurden, in die Färbewanne gelegt. Das Gel wurde nun im Dunkeln für 30 min gefärbt. Nach Beendigung des Färbens wurde die Färbelösung vorsichtig in dafür vorgesehene Behältnisse gegossen und anschließend über eine Aktivkohle-Säule adsorbiert.

Entfärben

Zum Entfärben wurde der Laufpuffer aus der Elektrophoresekammer verwendet. Dafür wurde ungefähr die gleiche Menge, die zum Färben des Gels verwendet wird, in die Entfärbewanne gegossen und das Gel für 15 min

entfärbt. Mit dieser Lösung wurde nach Ende des Entfärbens genauso verfahren, wie mit der Färbelösung.

Fotografieren

Das Gel wurde im Chemilmager auf den UV-Transilluminator gelegt, die Tür geschlossen und mit Hilfe der dazugehörigen Software unter UV-Licht digital fotografiert.

[KRONDORFER, 2008]

3.2.5. DGGE – Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese

Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese ist die am meisten genutzte Kultivierungsunabhängige Fingerprint-Methode, basierend auf 16S rRNA-Sequenzen. Bei der DGGE werden PCR-Amplikons gleicher Größe, aber unterschiedlicher Sequenz aufgetrennt. PCR-DGGE wurde 1993 von Muyzer et al. in der Molekularbiologie etabliert.

Doppelsträngige DNA-Fragmente werden in einem DGGE Gel aufgrund ihres unterschiedlichen Denaturierungs (Melting) Profiles aufgetrennt [ERCOLINI, 2004]. Bei der DGGE wird die denaturierende Umgebung durch eine Kombination aus einer konstanten Temperatur, üblicherweise zwischen 50 und 65°C und einem linear ansteigenden denaturierendem Gradienten geschaffen [ANUKAM und REID, 2007]. Die Fragmente wandern in einem Acrylamid-Gel entlang dieses linear ansteigenden Gradienten an denaturierendem Agens (Urea und Formamid). An den sogenannten „melting domains“ beginnen sie teilweise zu denaturieren. Die Schmelztemperatur (T_m) dieser Domänen ist Sequenz-spezifisch. Wenn die T_m der niedrigsten „melting domain“ erreicht wird, wird dieser Teil des Fragments teilweise denaturiert und es bildet sich daraus ein verzweigtes Molekül, wodurch die elektrophoretische Mobilität der DNA verringert wird. Das Anhängen einer 30- bis 40-bp langen GC-Klammer an einen der beiden PCR Primer, sorgt dafür, dass die Fragmente der DNA nach der PCR teilweise doppelsträngig erhalten bleiben. Das Bandenmuster der DGGE kann nachfolgend mittels Ethidiumbromid-Färbung, sowie SYBR Green oder Silberfärbung visualisiert werden [ERCOLINI, 2004].

Geräte und Materialien

- DGGE-Apparatur „DCode System“: Gelgießstand, 4 Glasplatten, 4 Abstandhalter, 4 Randklemmen, 2 Probenkämme, Puffertank, Kern, Haube, Power Supply „Power Pac“; Bio-Rad GesmbH
- Gradientenmischer Model 485, Bio-Rad GesmbH
- 2 Magnetrührer „Big Squid“, IKA GmbH & Co. KG
- 2 Magnetrührstäbe
- Kolbenhubpipetten, diverse Größen, Fa. GILSON
- Pipettenspitzen, Biozym GmbH
- Sterilin-Gefäße, 30 ml, Greiner Bio-One GmbH
- 500 ml Glasflaschen, Schott AG
- 100 ml Messkolben, Schott AG
- 1,5 ml Eppendorf-Gefäße, Biozym GmbH
- Löffel
- Waage 1207 MP, Sartorius AG
- Filterpapier, Plastikfolie
- Chemilmager 5500, Alpha Innotech Ltd., San Leandro, CA, USA
- Bind-ET, AL Labortechnik, Austria

Reagentien

- 70 % Ethanol, Roth GmbH & Co. KG
- Harnstoff, Serva GmbH, Nr. 24524
- Formamid, Serva GmbH, Nr. 39604
- Ammoniumpersulfat, Serva GmbH, Nr. 13375
- TEMED (N, N, N, N-Tetramethylethylendiamid), Serva GmbH, Nr. 35930
- 40 % Acrylamid/Bis, Serva GmbH, Nr. 10681
- Glycerin 86 %, Roth GmbH & Co. KG, Nr. 7533.1
- Bromphenolblau A4968, AppliChem GmbH
- Xylene Cyanol FF A4976, AppliChem GmbH
- EDTA 0,5 M, pH 8
- Tris A1086, AppliChem GmbH
- Eisessig, Roth GmbH & Co. KG
- Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml), Art. Nr. 2218.2, Roth GmbH & Co. KG

Lösungen

PER-Lösung

48 mg Ammoniumpersulfat

480 µl UHQ-Wasser

0 % Denaturierungslösung

20 ml 40 % Acrylamid/Bis

2 ml 50x TAE-Puffer

78 ml UHQ-Wasser

100 % Denaturierungslösung

42 g Harnstoff

20 ml 40 % Acrylamid/Bis

2 ml 50x TAE-Puffer

40 ml Formamid

Mit UHQ-Wasser bis zur 100 ml-Marke auffüllen.

50x TAE-Puffer

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

100 ml EDTA (0,5 M, pH 8)

Auf 1000 ml mit UHQ-Wasser auffüllen, autoklavieren (121 °C, 15 min).

1x TAE-Puffer

20 ml 50x TAE, gelöst in 980 ml UHQ-Wasser

Loading Dye

250 µl Bromphenolblau (2 %)

250 µl Xylene Cyanol (2 %)

8 ml Glycerin (86 %)

1,5 ml UHQ-Wasser

Durchführung

Die 100 %-Denaturierungslösung aus dem Kühlschrank wurde ca. 2 Stunden bevor die Gradienten-Lösungen hergestellt wurden, bei Raumtemperatur auf den Magnetrührer gestellt, um die starken Kristalle (ausgebildet durch den enthaltenen Harnstoff) zu lösen. Dann wurden die 4 Glasplatten mit 70 % Ethanol gereinigt, die Gelträger zusammengebaut und im Gelgießstand fixiert. Nun wurde die Dichtheit des Systems geprüft. Dazu wurde destilliertes Wasser zwischen die Glasplatten gefüllt und das Ganze 10 min stehen gelassen. Wenn das System dicht ist, also innerhalb der 10 min kein Wasser ausläuft, kann das Wasser weggegossen werden. Nachdem das System mit Filterpapier nachgetrocknet wurde, konnten die Gradientenlösungen hergestellt werden. Nun wurde auch die PER-Lösung vorbereitet und die 0 %-Denaturierungslösung bereitgestellt.

Es wurde mit einem 35 – 55 % Gradienten gearbeitet. Die genauen Mengen sowohl der 0 % - als auch der 100 %-Denaturierungslösungen sind in Tabelle 3-23 gezeigt.

Tab. 3-23: Zusammensetzung der Gradientenlösungen

Gradient 35 – 55 %	0 % - Denaturierungslösung	100 % - Denaturierungslösung
35 % Gradientenlösung (L)	10,4 ml	5,6 ml
55 % Gradientenlösung (H)	7,2 ml	8,8 ml

Wichtig ist, dass immer zuerst die 0 %-Denaturierungslösung pipettiert wird, da sich sonst ein Niederschlag bildet. Nun wurde beiden Lösungen kurz vor dem Gießen des Gels sowohl 120 µl PER-Lösung als auch 12 µl TEMED hinzugefügt. Die Röhrchen wurden verschlossen und durch vorsichtiges Schwenken die Flüssigkeiten gemischt. Mittels Spritzen wurden die 35 % Gradientenlösung und auch die 55 % Gradientenlösung aufgezogen, die Spritzen in den Gradientenmischer eingesetzt, die verwendeten Schläuche verbunden und das Gel gegossen. Nach dem Gießen wurde der Probenkamm ins Gel eingesetzt und die Spritzen und Schläuche sofort mit destilliertem Wasser gespült. Dies verhindert ein Verstopfen durch polymerisierende Gelreste. Das Gel muss ungefähr 3 Stunden polymerisieren. Etwa eine Stunde vor Polymerisationsende wurden 6 Liter 1x TAE-Puffer hergestellt und

in den Tank gefüllt. Der Tank wurde auf einen Magnetrührer gestellt und dem Puffer ein Rührkern beigelegt. Der Deckel wurde auf den Tank gesetzt und der Laufpuffer mittels des Heizrührstabs auf 60 °C aufgeheizt. Nachdem das Gel fertig auspolymerisiert war, wurden die Kämme aus beiden Gelen entfernt und die Gele in die zuvor mit Wasser benetzte Gelhalterung eingesetzt. Die Kammer zwischen den Gelen wurde mit 1x TAE Puffer aufgefüllt und ebenfalls die Dichtheit kontrolliert. Bevor die Gelhalterung nun in den Tank eingehängt wurde, wurden die Geltaschen noch durch mehrmaliges auf- und abpipettieren zuerst mit dem Puffer und anschließend nochmals mit Luft gespült. Falls der Pufferstand nicht am Maximum ist wird noch mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt. Die Apparatur wurde wieder auf 60 °C aufgeheizt und in der Zwischenzeit die Proben vorbereitet. Dafür wurden 16 µl Probe (PCR-Produkt) im Verhältnis 1:1 mit dem Loading dye versetzt. Wenn die Apparatur wieder 60°C erreichte, wurden die Proben in die Geltaschen aufgetragen, der Deckel wieder aufgesetzt und der Heizstab und die Pumpe eingeschaltet. Es wurde nochmals kurz gewartet bis die erforderlichen 60 °C erreicht waren und dann wurde der Power Supply eingeschaltet.

Einstellung für die DGGE: 70 Volt für 960 Minuten.

Nach Ablauf der 16 Stunden wurde die Apparatur ausgeschaltet, zerlegt und die Gele auf eine Transportfolie gegeben. Die rechte obere Ecke des Gels wurde durch Abschneiden markiert, um so die letzte Probe zu kennzeichnen. Anschließend wurden die Gele in 600 ml UHQ-Wasser, versetzt mit 60 µl Ethidiumbromid, für 45 min gefärbt und dann für 15 min in 600 ml des Laufpuffers entfärbt. Die Gele wurden so wie Agarosegele unter UV-Licht digital fotografiert, allerdings mit längerer Detektionsdauer.

Ausschneiden der Banden

Geräte und Reagenzien

- 1 Skalpellhalter, Swann-Morton Ltd.
- 1 sterile Klinge für den Skalpellhalter, Swann-Morton Ltd.
- 1 UV-Schutzschild ANSI Z87, Nalgene Corp., Rochester, NY, USA
- 1,5 ml Eppendorf-Gefäße, Eppendorf AG

-
- Chemilmager 5500, Alpha Innotech Ltd., San Leandro, CA, USA
 - Kühlschrank 4 °C, Electrolux GmbH
 - 10x PCR-Puffer F-511, Finnzymes Oy, Espoo, Finnland

Durchführung

Banden von Interesse wurden unter UV-Licht einzeln mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Jede dieser ausgeschnittenen Banden wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Gelstücke zuerst mit 100 µl 1x PCR-Puffer gewaschen und dann in 100 µl 1x PCR-Puffer bei 4°C über Nacht stehen gelassen. Am darauffolgenden Tag wurde eine PCR mit der aus dem Gel diffundierten DNA durchgeführt, allerdings wurde dafür der Primer ohne GC-Klammer verwendet.

[KRONDORFER, 2008]

3.2.6. Reinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung

Zur Aufreinigung der PCR Produkte wurde der PCRExtract Mini Kit von 5PRIME verwendet.

PCRExtract Mini Kit

Inhalt

- Mini Columns CB2, Collection Tubes 2 ml
- Puffer BL
- Puffer PD
- Puffer PW (Konzentrat, reines Ethanol wird zugegeben)
- Puffer PEB

Geräte

- Zentrifuge 5417R, Eppendorf AG
- Kühlschrank 4 °C, Electrolux GmbH
- Kühlschrank -20 °C, Elektra Bregenz AG
- Ethanol (70 % und 96 %), Roth GmbH & Co. KG

Durchführung

Die PCRExtract Mini Columns CB2 wurden in ein 2 ml Collection Tube gegeben und anschließend mit 500 µl BL Puffer 1 min bei 12000 min⁻¹ zentrifugiert, um die Columns zu equilibrieren. Das Eluat wurde verworfen. Anschließend wurden 5 Teile PD Puffer mit 1 Teil des PCR Produktes gemischt und um die DNA zu binden wurde die Probe zuerst 2 min inkubiert, bevor dann für 1 min bei 12000 min⁻¹ zentrifugiert wurde. Das Eluat wurde wieder verworfen und die DNA erst mit 700 µl PW Puffer und dann mit 500 µl PW Puffer bei jeweils einem weiteren 1 minütigen Zentrifugationsschritt gewaschen. Danach wurde das Eluat verworfen und das Column allein bei 12000 min⁻¹ für 2 min zentrifugiert, um Reste des Puffers zu entfernen.

Die Columns wurden dann für einige Minuten mit offenen Deckeln an der Luft getrocknet, um die Membran zu trocknen. Um nun die DNA zu eluieren wurden die Columns in saubere 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und 50 µl PEB Puffer in die Mitte der Membran pipettiert. Das Ganze wurde nochmals für 2 min inkubiert und anschließend 1 min bei 12000 min⁻¹ zentrifugiert.

[KRONDORFER, 2008]

3.2.7. Sequenzierung

15 µl der gereinigten DNA sowie 15 µl des dazugehörigen Primers (2 pmol/µl) wurden zur Firma Eurofins MWG/Operon, Deutschland, zum Sequenzieren geschickt.

Unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> konnten die erhaltenen Sequenzen eingegeben werden. Für die Auswertung gilt: Der Treffer mit der höchsten Prozent-Identität (% Identity) und dem niedrigsten E-Value wird notiert. Der E-Value gibt die Signifikanz des Ergebnisses an, je niedriger dieser Wert ist, desto signifikanter ist der Treffer.

[KRONDORFER, 2008]

4. Ergebnisse

4.1. Mikrobiologische Ergebnisse

4.1.1. Semiquantitative Keimzahlbestimmung

Die Keimzahl der Lactobacillen von Swab 1 wurden durch die Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-4} auf MRS-Agar mittels Koch'schem Plattenverfahren quantitativ ermittelt. Dazu wurden die ausgestrichenen Platten für 48 Stunden bei 37°C anaerob inkubiert und anschließend die Kolonien ausgezählt. In der nachfolgenden Tabelle 4-1 sind die Ergebnisse der semiquantitativen Keimzahlbestimmung dargestellt:

Tab. 4-1: Keimzahlen auf MRS-Agar

Probe	Mund (M1)	Vagina (V1)	Rektum (R1)
P31	$2,3 \cdot 10^4$	$> 3 \cdot 10^6$	$> 3 \cdot 10^6$
P32	$1,8 \cdot 10^5$	$> 3 \cdot 10^6$	$> 3 \cdot 10^6$
P33	$> 3 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^4$	$> 3 \cdot 10^6$
P34	$2 \cdot 10^4$	$> 3 \cdot 10^6$	$> 3 \cdot 10^6$
P35	$4 \cdot 10^4$	$> 3 \cdot 10^6$	0
P36	0	$> 3 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$
P37	0	$> 3 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$
P38	$9,1 \cdot 10^4$	0	$5,9 \cdot 10^4$
P39	$3,8 \cdot 10^4$	$> 3 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^5$
P40	$9,2 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^4$
P41	$1,5 \cdot 10^5$	0	$2,8 \cdot 10^4$
P42	$6,8 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$
P43	$> 3 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$
P44	0	$> 3 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$
P45	$2,1 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^5$
P46	$1,0 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$
P47	$4 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^3$
P48	$3 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$> 3 \cdot 10^6$
P49	$> 3 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^4$	$> 3 \cdot 10^6$
P50	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$> 3 \cdot 10^6$
P51	$1 \cdot 10^4$	$4,8 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$
P52	$2,1 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^6$
P53	$> 3 \cdot 10^6$	$> 3 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$

Probe	Mund (M1)	Vagina (V1)	Rektum (R1)
P54	$> 3 \cdot 10^6$	0	$1,8 \cdot 10^6$
P55	$7,7 \cdot 10^5$	$6,2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^3$
P56	$2,1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^6$
P57	$3 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^4$	$> 3 \cdot 10^6$
P58	$3,0 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^3$
P59	$2,4 \cdot 10^6$	0	$6 \cdot 10^2$
P60	$4,8 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$

Normalerweise werden die Hefekolonien beim Auszählen der Platten miterfasst, allerdings konnte bei dieser Versuchsgruppe im Vergleich zu den Schwangeren kein Auftreten von Hefen beobachtet werden.

Die Keimzahlen der Proben P31 bis P60 sind in den folgenden Abbildungen grafisch dargestellt:

Die Keimzahlen, die deutlich über dem auszählbaren Bereich liegen sind in der Graphik mit $>3 \cdot 10^6$ angegeben.

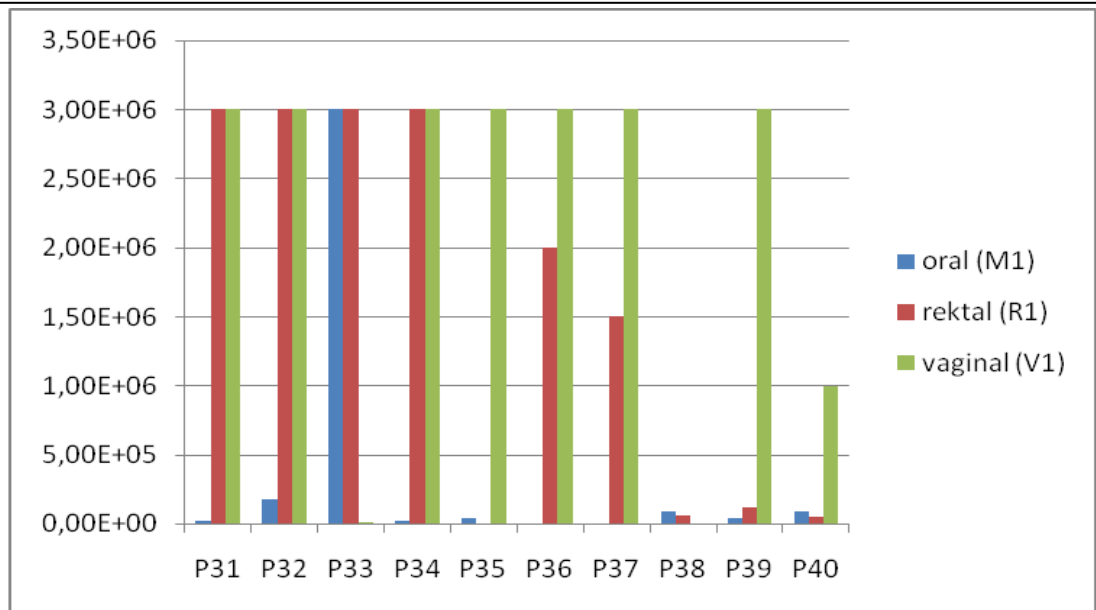


Abb. 4-1: Keimzahlen der Proben P31 – P40 im Gegenüberstellung der Ergebnisse von Mund, Vagina und Rektum.

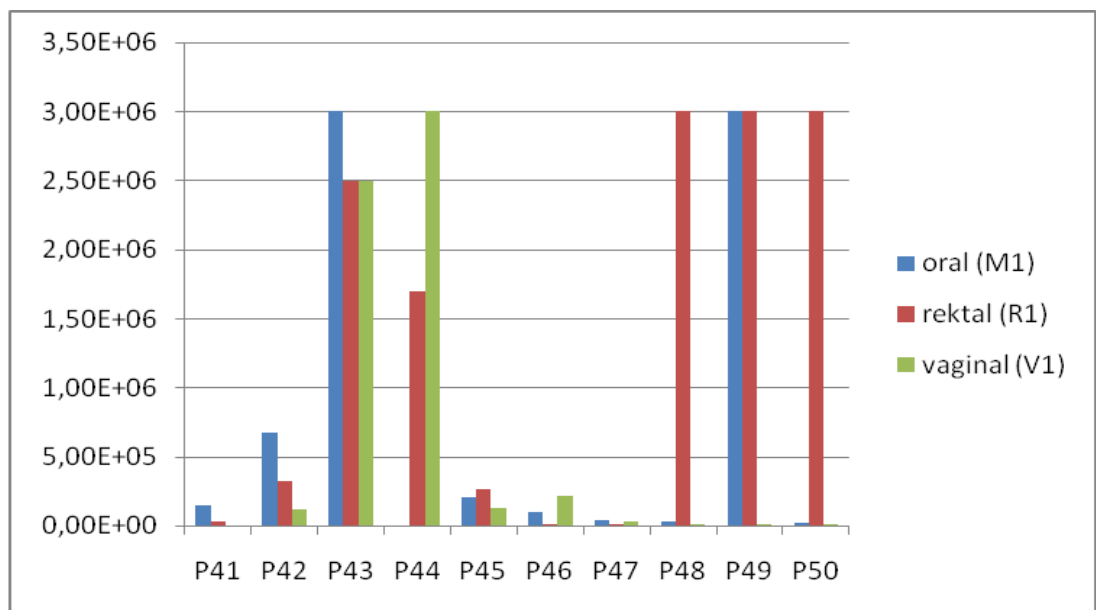


Abb. 4-2: Keimzahlen der Proben P41 – P50 im Gegenüberstellung der Ergebnisse von Mund, Vagina und Rektum.

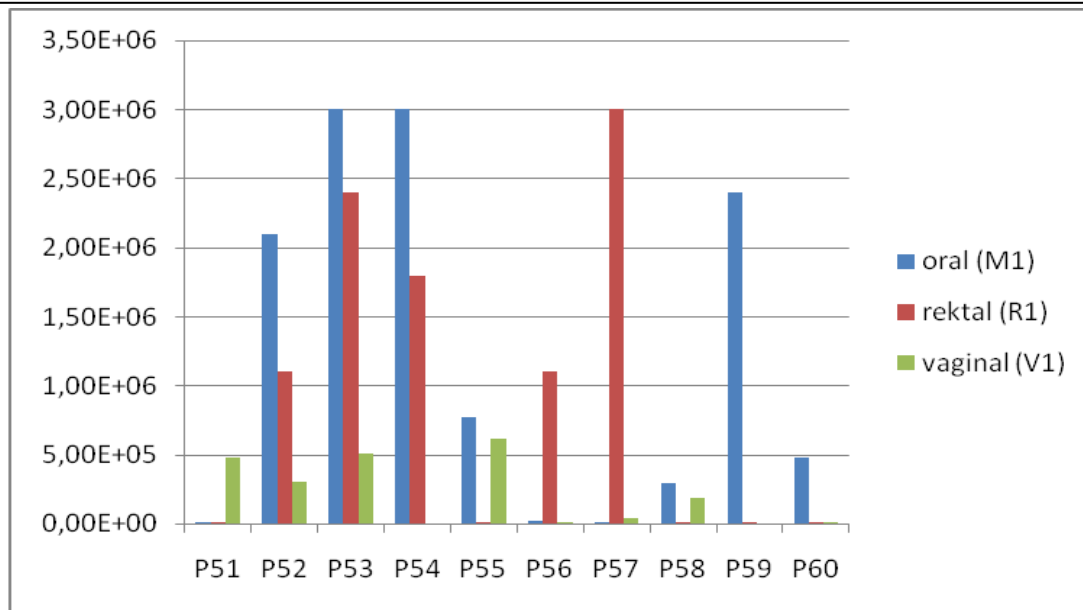


Abb. 4-3: Keimzahlen der Proben P51 – P60 im Gegenüberstellung der Ergebnisse von Mund, Vagina und Rektum.

4.1.2. Subkultivierung von Einzelkolonien

Nach der Keimzahlbestimmung wurden alle unterschiedlichen Kolonieförmungen mittels fraktioniertem Ausstrich weiterüberimpft.

Insgesamt konnten 274 Isolate von den 30 Versuchspersonen gewonnen werden, die genaue Aufteilung ergab sich wie folgt: 92 Isolate oral, 82 Isolate vaginal und 100 Isolate rektal.

Die nachfolgenden Untersuchungen zeigten, dass von den 274 Isolaten 136 Isolate in die Gruppe der Enterococccen einzuordnen sind, 16 Isolate zählen zu den Streptococccen, 4 Isolate zu *Leuconostoc* ssp. und je 1 Isolat war *Actinomyces neuii*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Lactococcus lactis*. Bei weiteren 69 Isolaten konnte nicht festgestellt werden um welche Bakterienart es sich handelte.

Somit handelte es sich nur bei 45 Isolaten um Lactobacillen.

4.2. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

4.2.1. Gattungs-spezifische PCR

Die durch Kultivierung erhaltenen Isolate wurden mittels Gattungs-spezifischer PCR voruntersucht, um festzustellen, ob es sich dabei wirklich um Lactobacillen handelte. Dafür wurden die Gattungs-spezifischen Primer Lac 1-f und Lac 2-r [WALTER, 2001] herangezogen, die bei ca. 350bp ein PCR-Produkt zeigen. Bei der Durchführung dieser Voruntersuchung zeigten relativ viele der Lactobacillenstämme kein Ergebnis. Aufgrund dessen wurden die negativen Isolate anschließend noch auf Enterococcen überprüft. Dazu wurden die Primerpaare Esp-p-1 und Esp-p-2 [RINTILLÄ, 2004] sowie DUT-E1, DUT-E2, DUT-F1 und DUT-F2 [DUTKA-MALEN, 1995] herangezogen.

Bei den folgenden Gelen, wurden als Positivkontrollen jeweils entweder *L. jensenii* (Lb 99), *L. crispatus* (Lb 6), *L. rhamnosus* (Lb 197) oder *L. gasseri* (Lb 3) bzw. *E. faecium* (En 3) oder *E. faecalis* (En 2) mitgeführt, die Negativkontrolle bestand aus dem PCR-Premix alleine, ohne DNA-Aliquot.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Gele der Gattungs-spezifischen PCR der Isolate P31 – P60 der kulturellen Methode (Abstrich 1).

Bei den Abbildungen 4-4 und 4-5 wurde als Positivkontrolle Lb 99 (*L. jensenii*) verwendet. Bei den Abbildungen 4-6, 4-7, 4-10 und 4-11 war die Positivkontrolle Lb 6 (*L. crispatus*). Bei den Abbildungen 4-8 und 4-9, sowie 4-16 bis 4-22 wurde Lb 197 (*L. rhamnosus*) als Positivkontrolle eingesetzt. Die Positivkontrolle Lb 3 (*L. gasseri*) wurde bei den Proben von Abbildung 4-12 bis 4-15 verwendet.

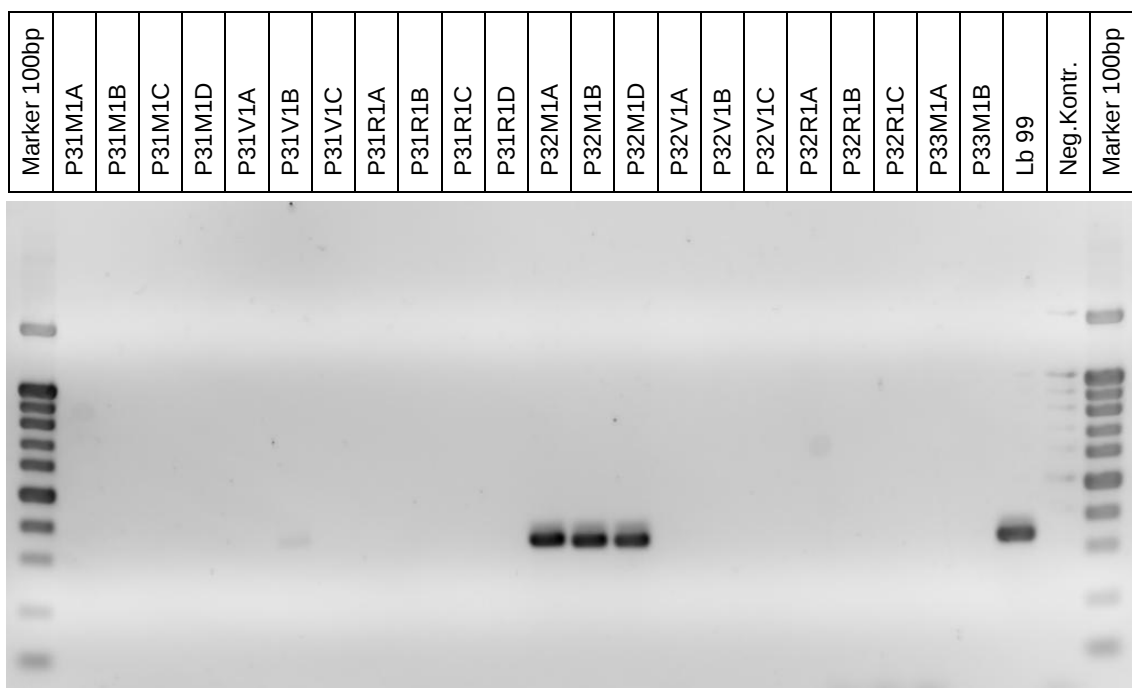


Abb. 4-4: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P31M1A-P33M1B

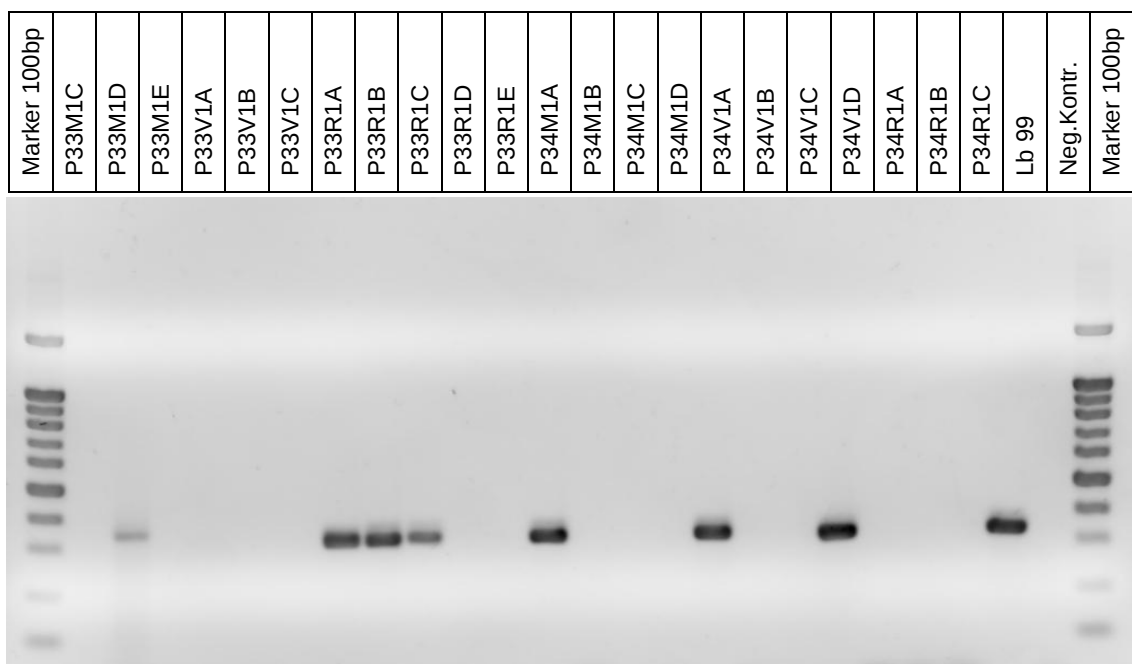


Abb. 4-5: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P33M1C-P34R1C

Marker 100bp
Neg.Kontr.
Lb 6
P35V1A
P40M1A
P40M1B
P40M1C
P40M1D
P40M1E
P40M1F
P41R1A
P41R1B
P42M1A
P42M1B
P42R1A
P42R1B
P42R1C
Marker 100bp



Abb. 4-6: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P35V1A; P40M1A-P42R1C

Marker 100bp
P42R1D
P42R1E
P42V1A
P42V1B
P42V1C
P42V1D
Lb 6
Neg. Kontr.
Marker 100bp

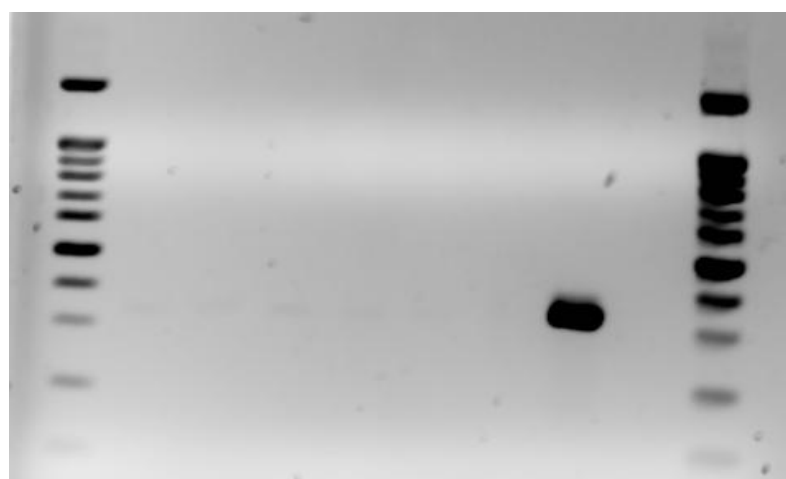


Abb. 4-7: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P42R1D-P42V1D

Marker 100bp
Neg.Kontr.
Lb 197
P36R1A
P36R1B
P36R1C
P36R1D
P36R1E
P36V1A
P36V1B
P36V1C
P37V1A
P38R1A
P38R1B
P38R1C
P38R1D
P38R1E
Marker 100bp

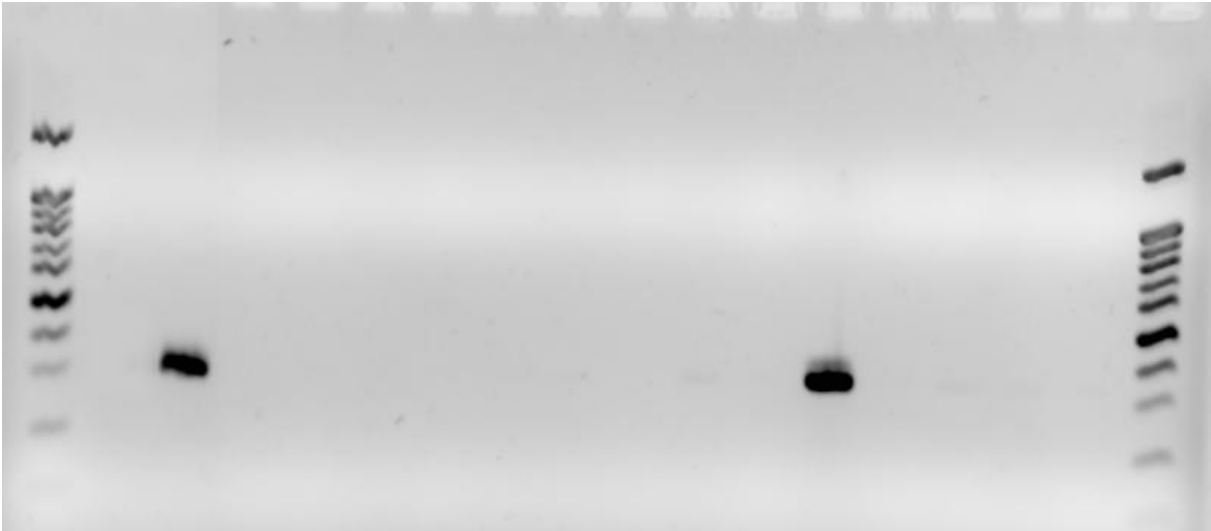


Abb. 4-8: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P36R1A-P38R1E

Marker 100bp
P39R1A
P39R1B
P39R1C
P39R1D
P39R1E
P39R1F
P39V1A
P39V1B
Lb197
Neg.Kontr.
Marker 100bp

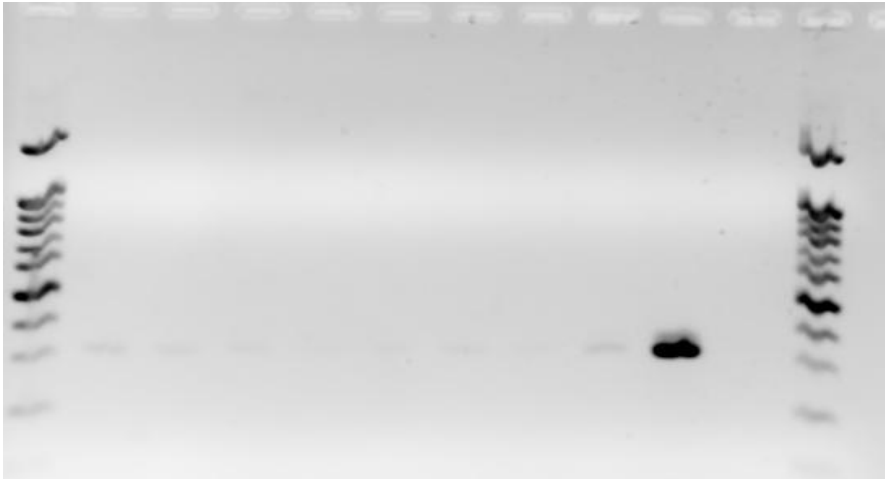


Abb. 4-9: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P39R1A-P39V1B

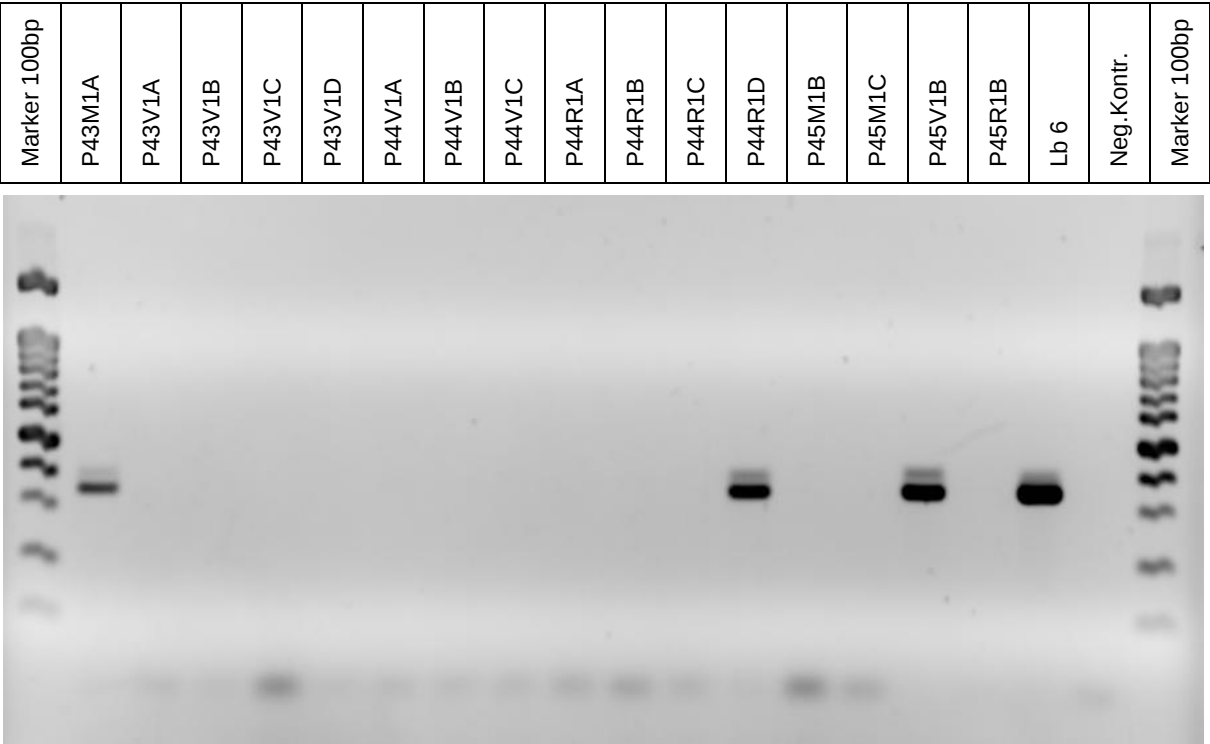


Abb. 4-10: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P43M1A-P45R1B

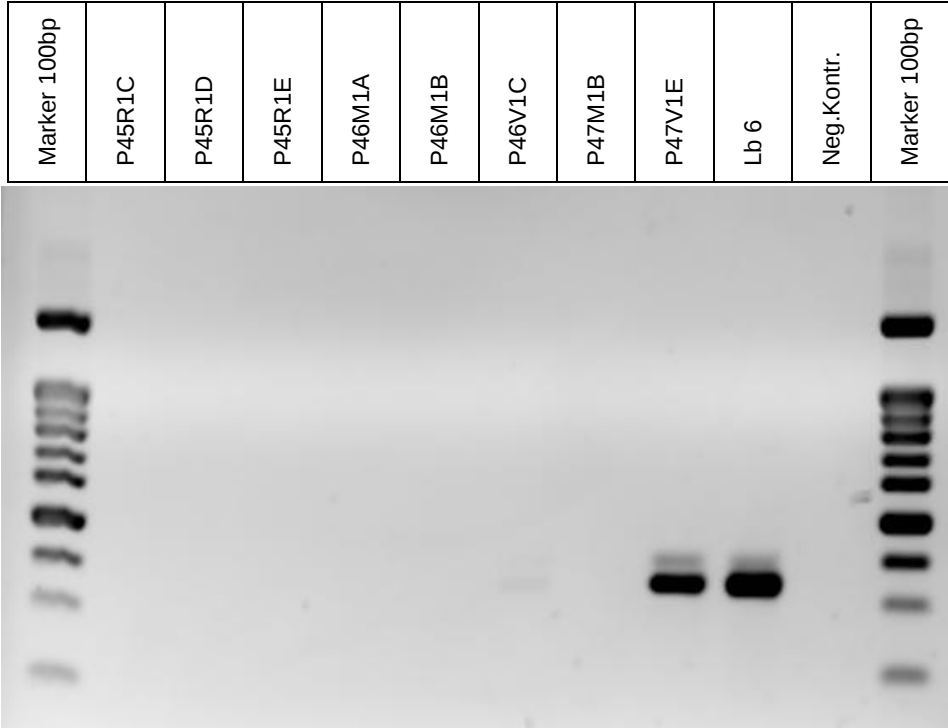


Abb. 4-11: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P45R1C-P47V1E

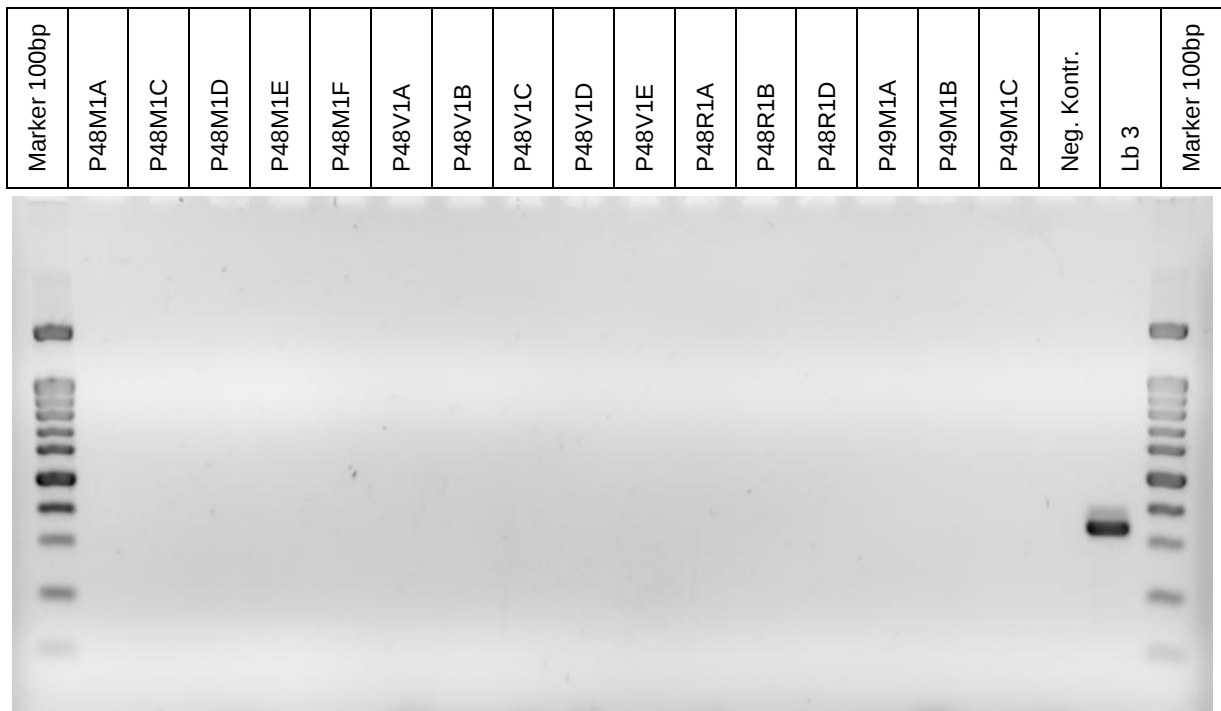


Abb. 4-12: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate 48M1A-P49M1C

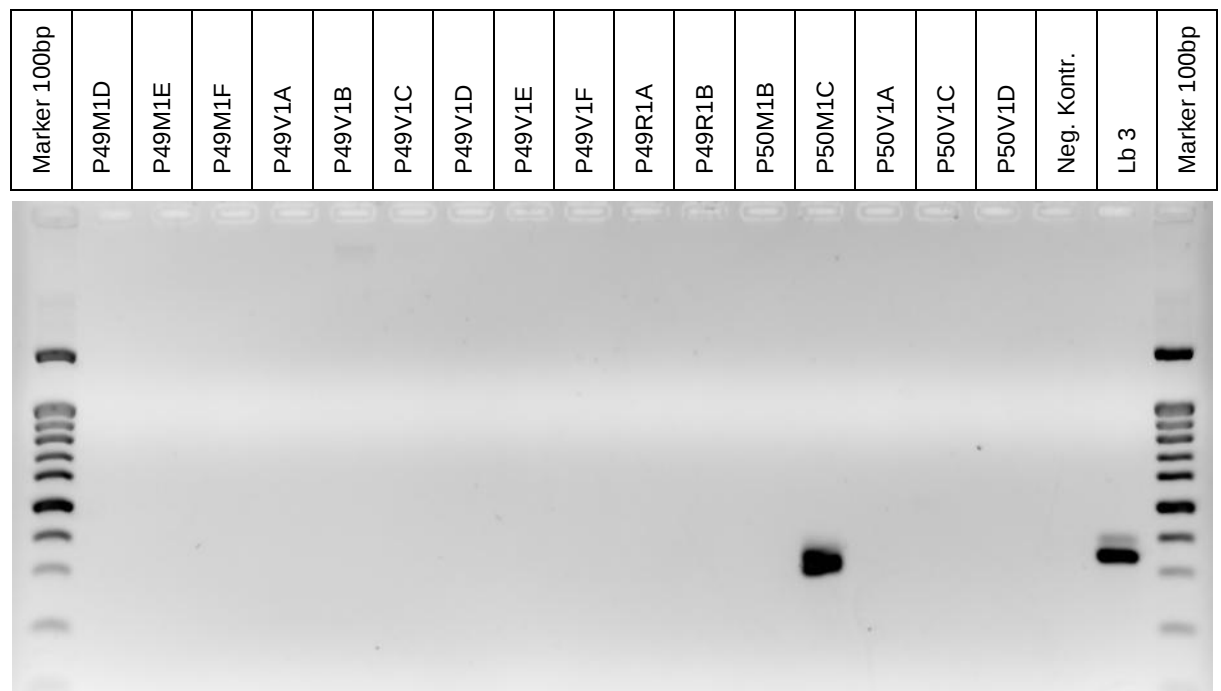


Abb. 4-13: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate 49M1D-P50V1D

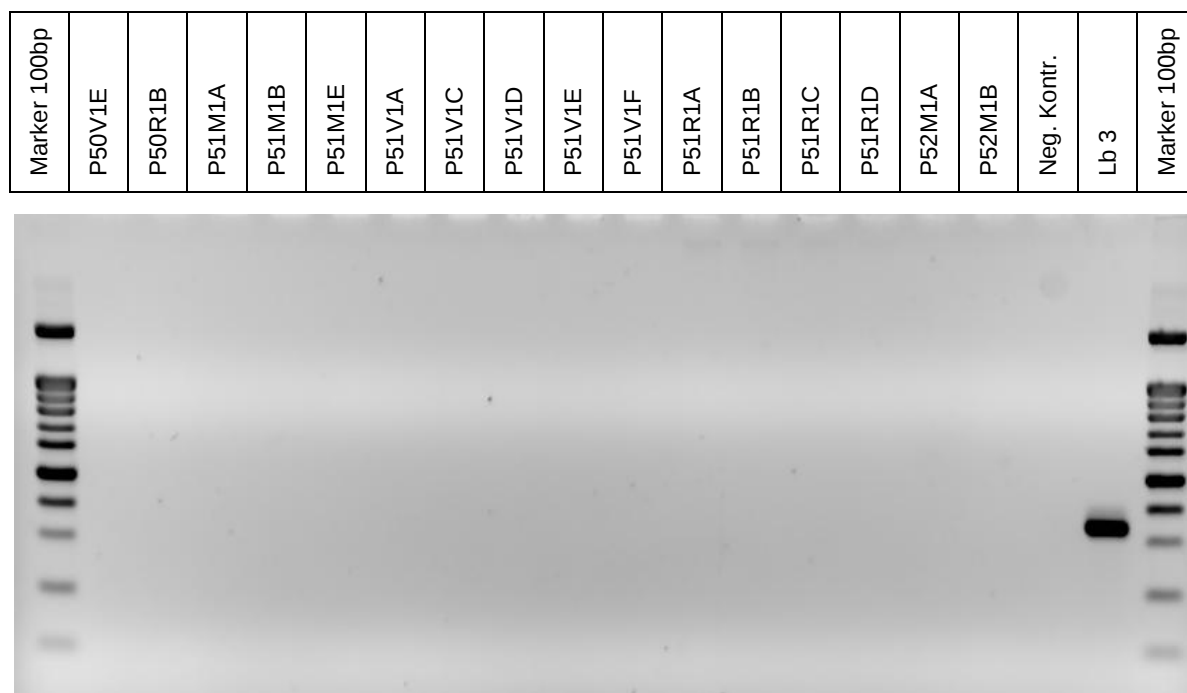


Abb. 4-14: Gattungsspezifische PCR der kulturellen Isolate P50V1E-P52M1B

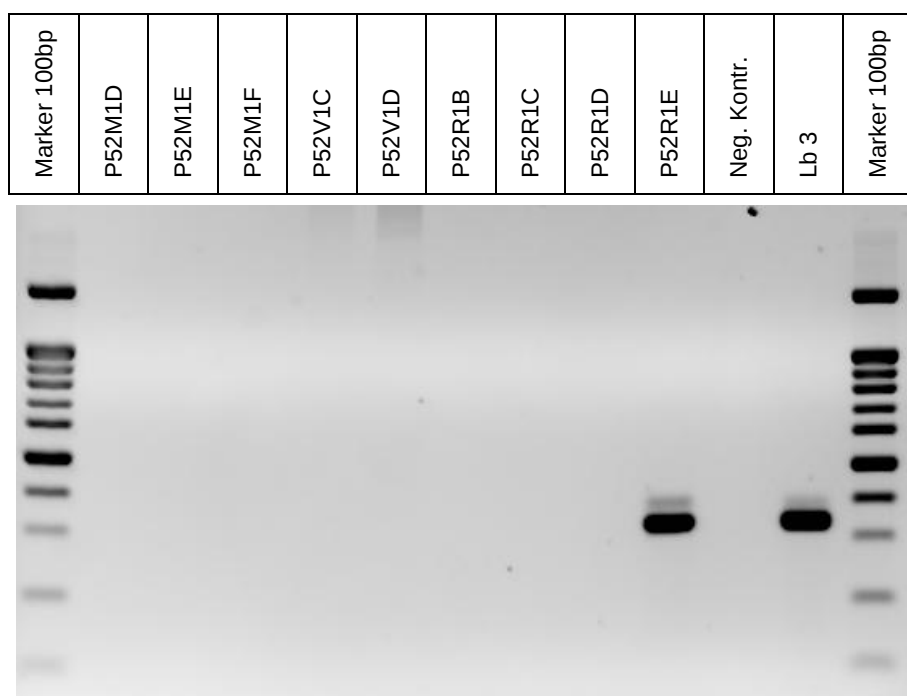


Abb. 4-15: Gattungsspezifische PCR der kulturellen Isolate P52M1D-P52R1E

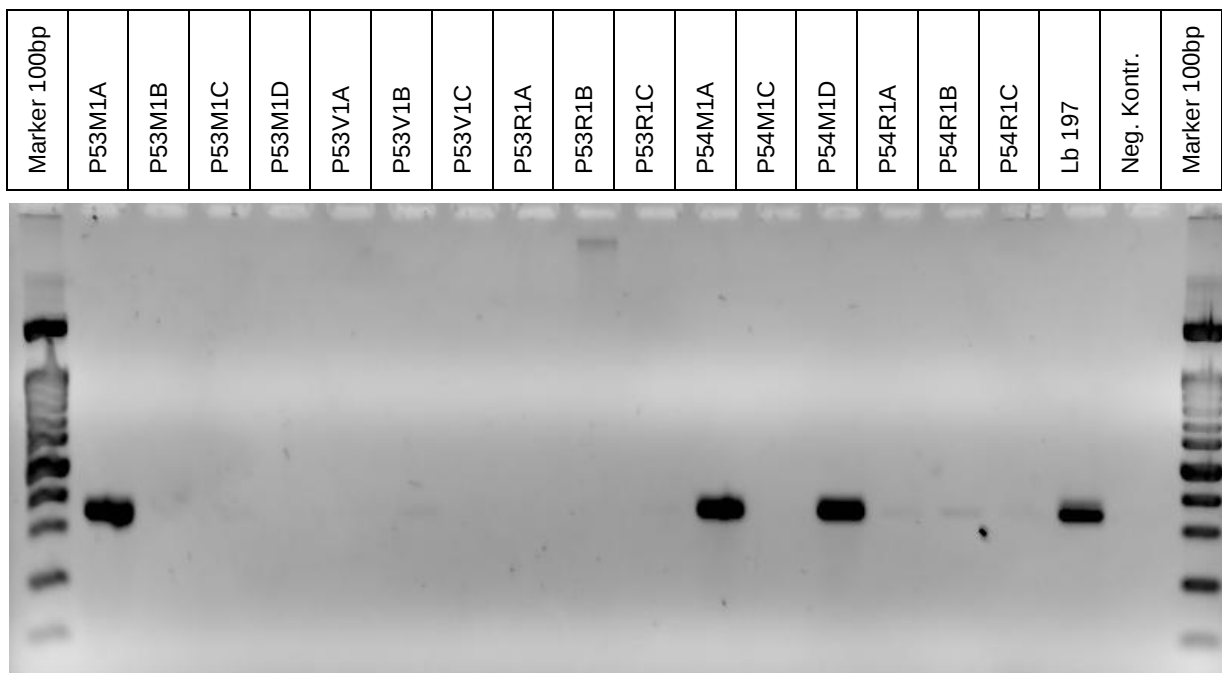


Abb. 4-16: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P53M1A-P54R1C

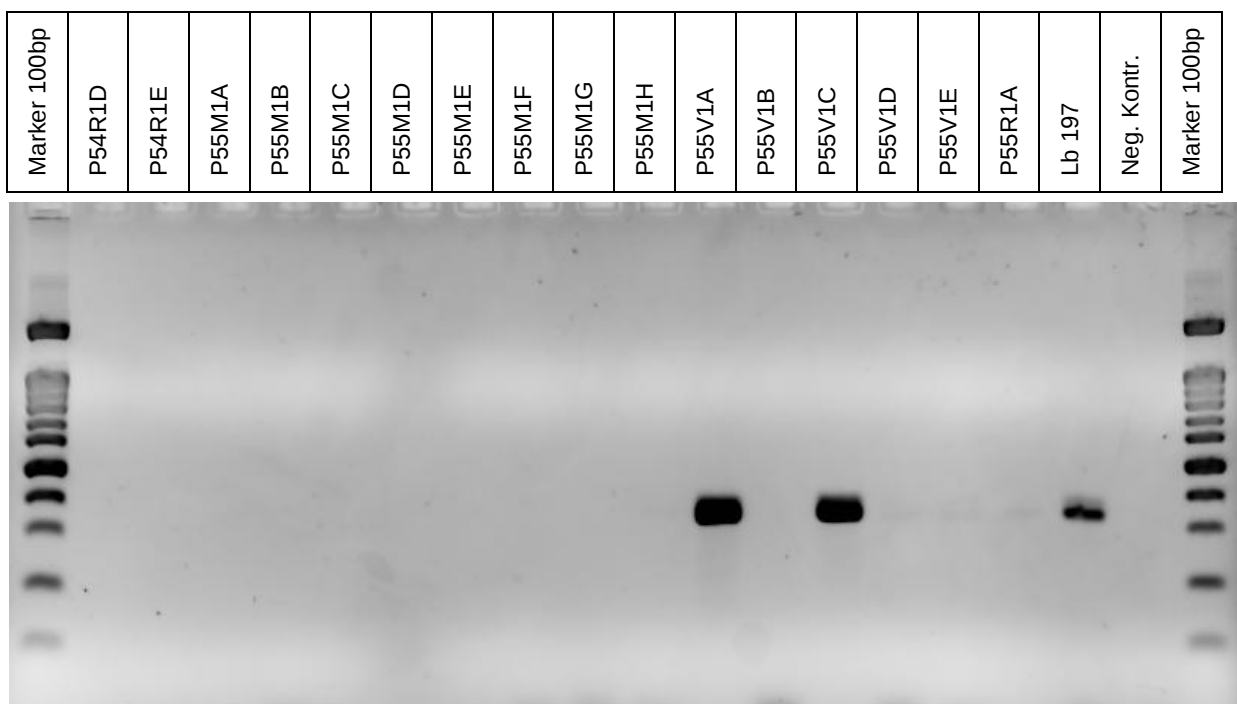


Abb. 4-17: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P54R1D-P55R1A

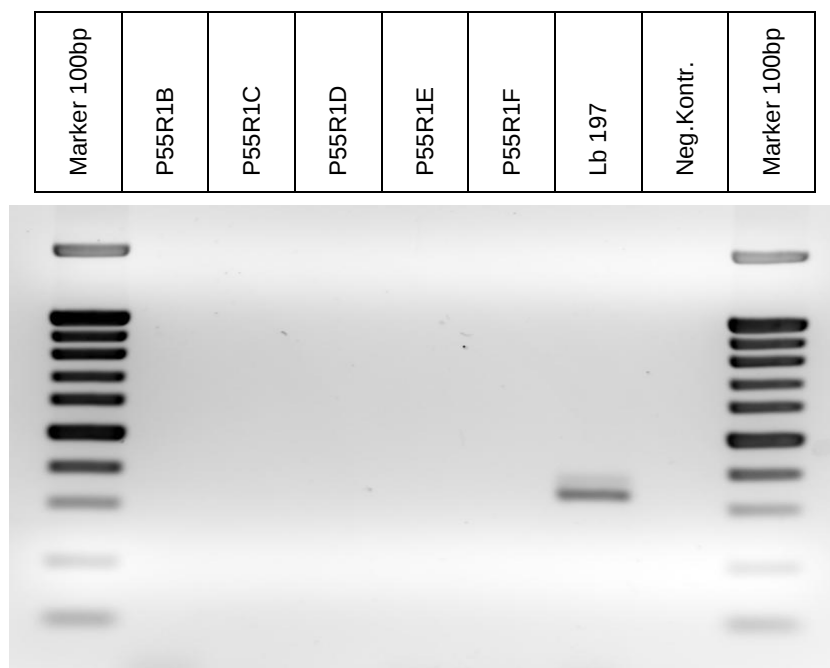


Abb. 4-18: Gattungsspezifische PCR der kulturellen Isolate P55R1B-P55R1F

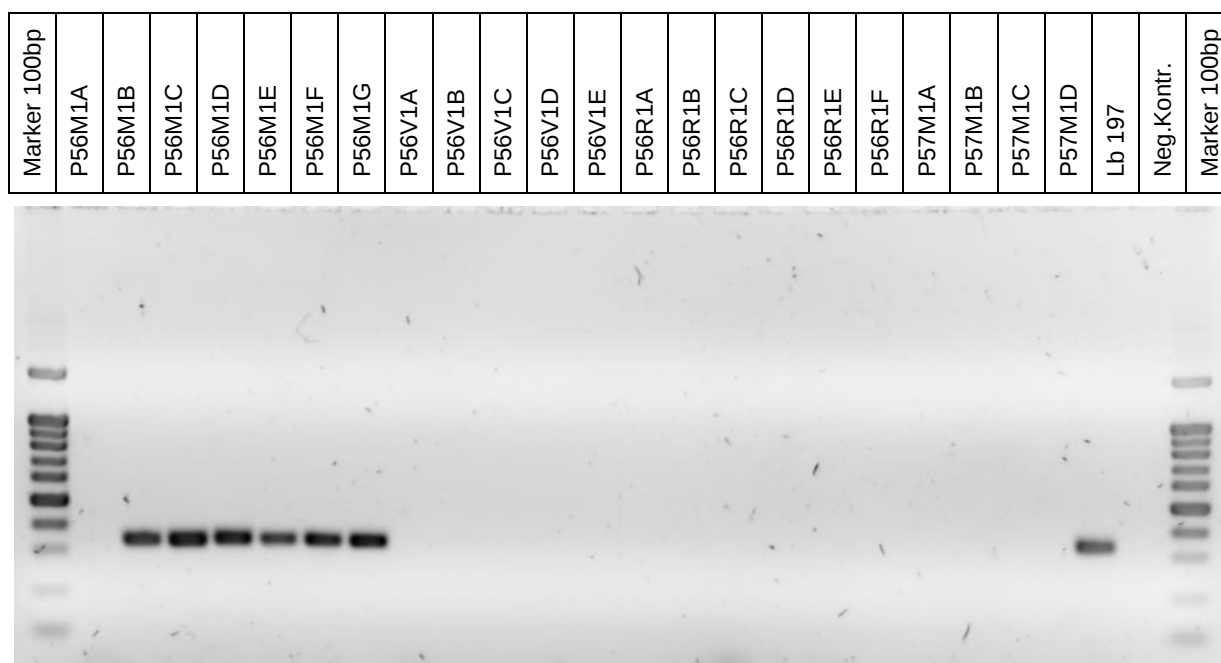


Abb. 4-19: Gattungsspezifische PCR der kulturellen Isolate P56M1A-P57M1D

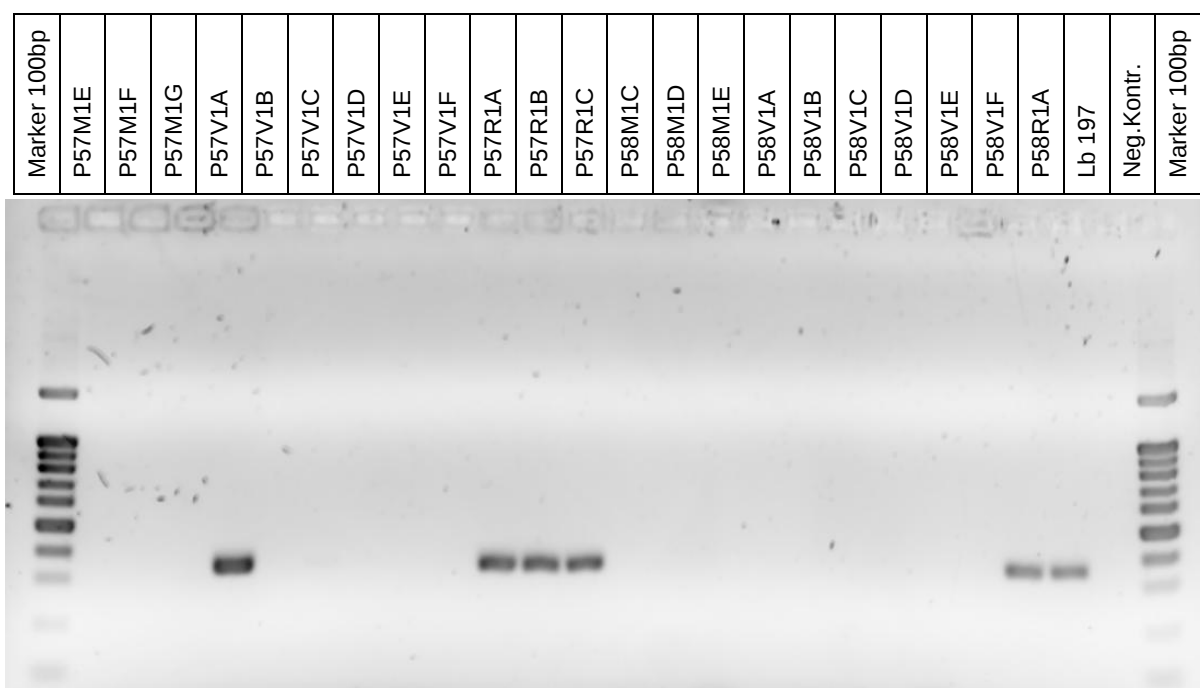
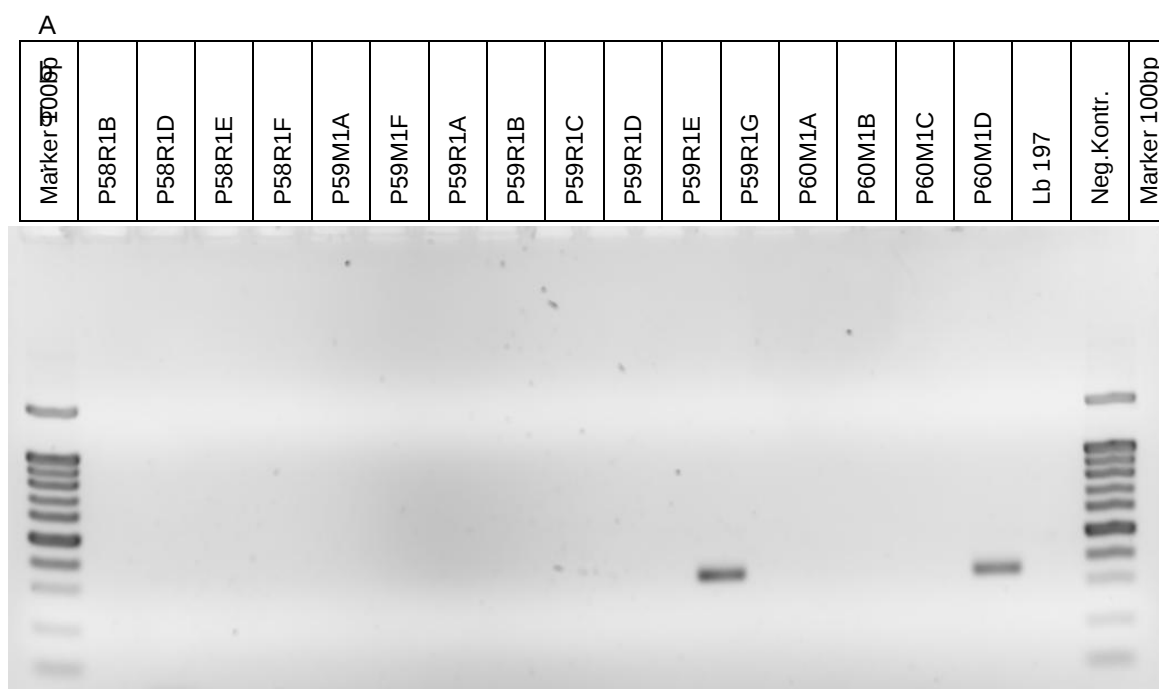


Abb. 4-20: Gattungsspezifische PCR der kulturellen Isolate P57M1E-P58R1A



4-21: Gattungsspezifische PCR der kulturellen Isolate P58R1B-P60M1D

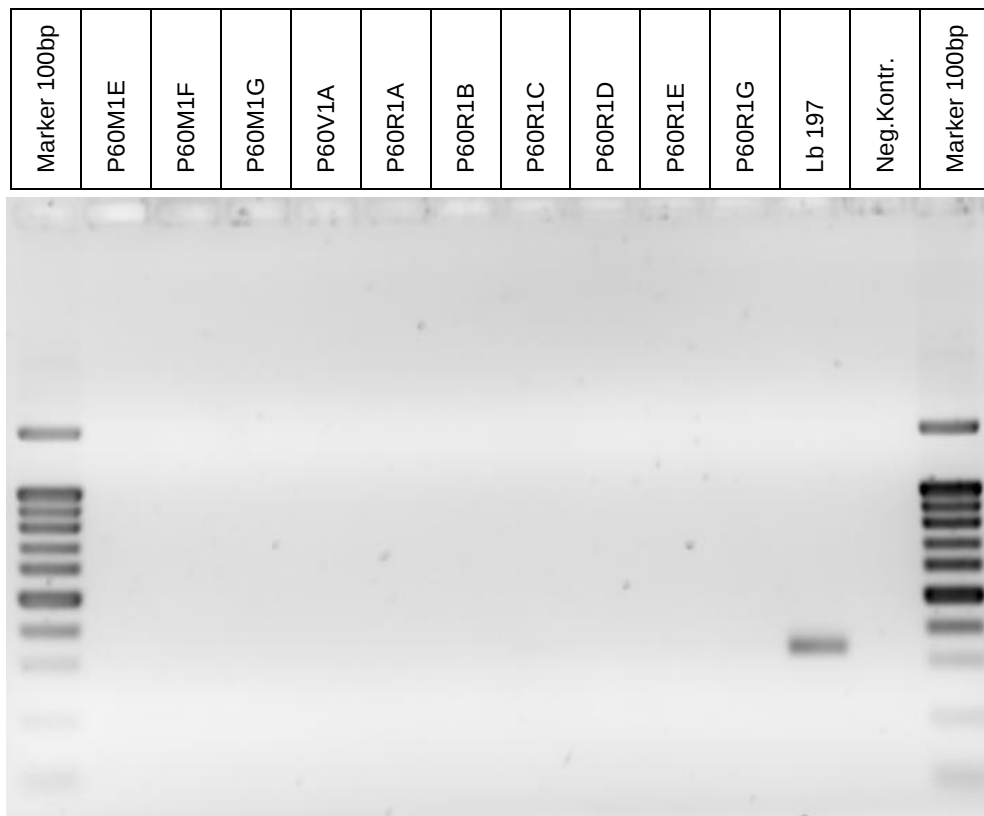


Abb. 4-22: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P60M1E-P60R1G

66 Isolate wurden als positiv eingestuft. Hierbei wurden auch sehr schwache Banden berücksichtigt. Wie sich bei genaueren Untersuchungen allerdings ergab handelte es sich nicht bei allen um Lactobacillen.

Da auch sehr viele Isolate negativ waren wurden einfach einige negative Isolate nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und weiter untersucht.

4.2.2. Multiplex-PCR

Um die als Lactobacillen-positiven Isolate genauer zu bestimmen, wurde anschließend an die Gattungsspezifische PCR eine Multiplex-PCR durchgeführt. Hierzu wurde nach Song et al., 2000 mit den Primern Ldel-7, LU-5, LU-3', LU-1' und Lac-2 gearbeitet. Die Isolate konnten daraufhin in 4 Gruppen unterteilt werden. Die Länge des PCR Produktes ist in jeder Gruppe unterschiedlich, es werden Banden bei 300 bp, 350 bp, 400 bp und 450 bp erhalten. Bei dieser PCR dienten *L. gasseri* (Lb 3; Bande bei 300 bp), *L. reuteri* (Lb 13; Bande bei 350 bp), *L. paracasei* ssp. *paracasei* (Lb 9; Bande bei 400 bp), sowie *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* (Lb 27; Bande bei 450 bp und 700 bp) als Positivkontrollen. Bei der Negativkontrolle handelte es sich um den Premix ohne ein DNA Aliquot.

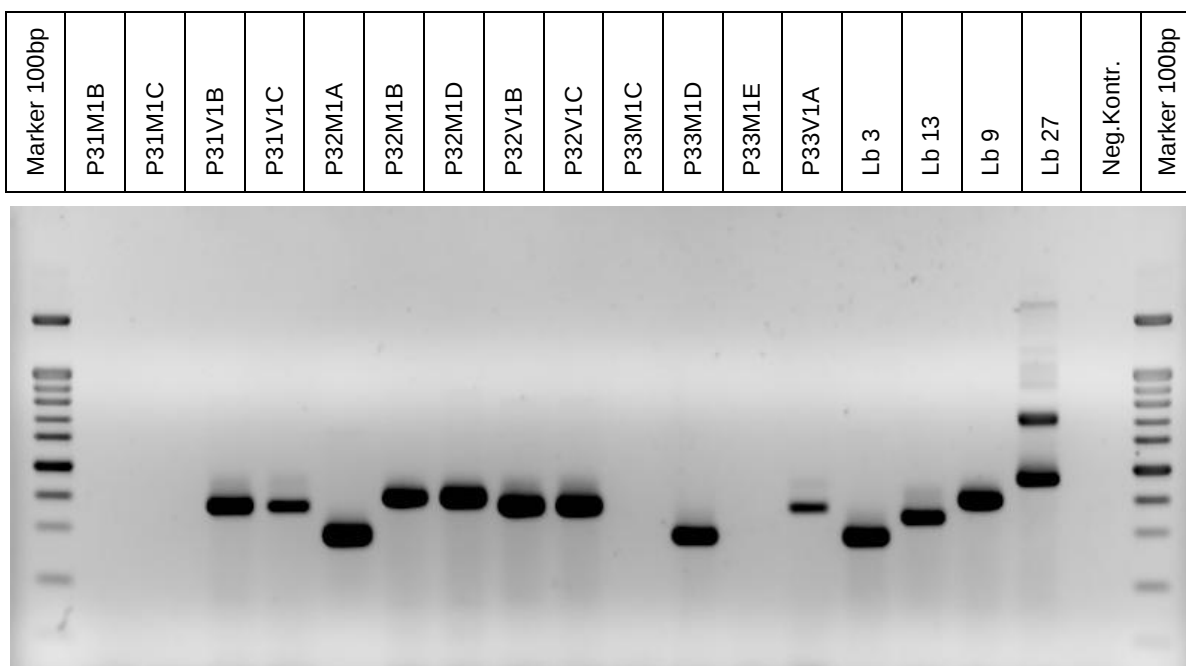


Abb. 4-23: Multiplex PCR der kulturellen Isolate P31M1B-P33V1A

Marker 100bp
P33V1B
P34M1A
P34M1B
P34M1C
P31R1A
P31R1B
P31R1C
P31R1D
P32R1B
P32R1C
P33V1C
P33R1A
P33R1B
Lb 3
Lb 13
Lb 9
Lb 27
Neg.Kontr.
Marker 100bp

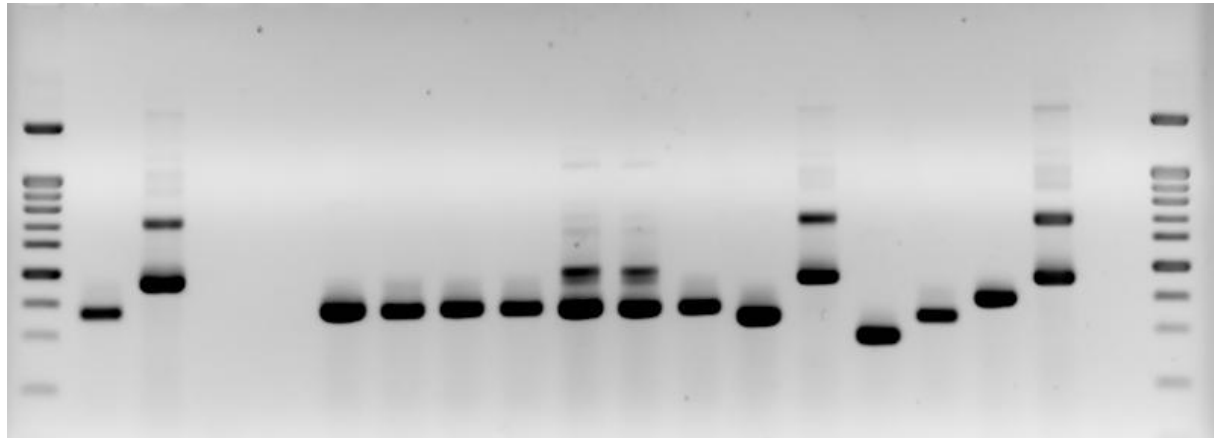


Abb. 4-24: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P33V1B-P33R1B

Marker 100bp
P33R1C
P34V1A
P34V1B
P34V1C
P34V1D
P34R1A
P34R1B
P34R1C
P35V1A
P40M1A
P40M1C
P40M1D
P40M1E
Lb 3
Lb 13
Lb 9
Lb 27
Neg.Kontr.
Marker 100bp

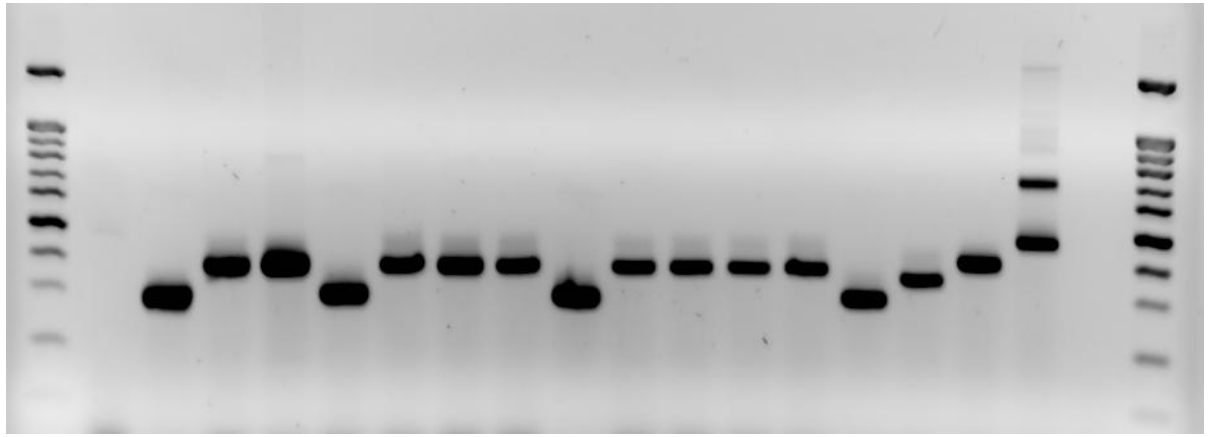


Abb. 4-25: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P33R1C-P35V1A und P40M1A-P40M1E

Marker 100bp
P40M1F
P41R1A
P42M1B
P42R1A
P42V1A
P42V1B
P42V1D
P36R1A
P36V1A
P36V1B
P36V1C
P37V1A
P38R1A
Lb 3
Lb 13
Lb 9
Lb 27
Neg.Kontr.
Marker 100bp

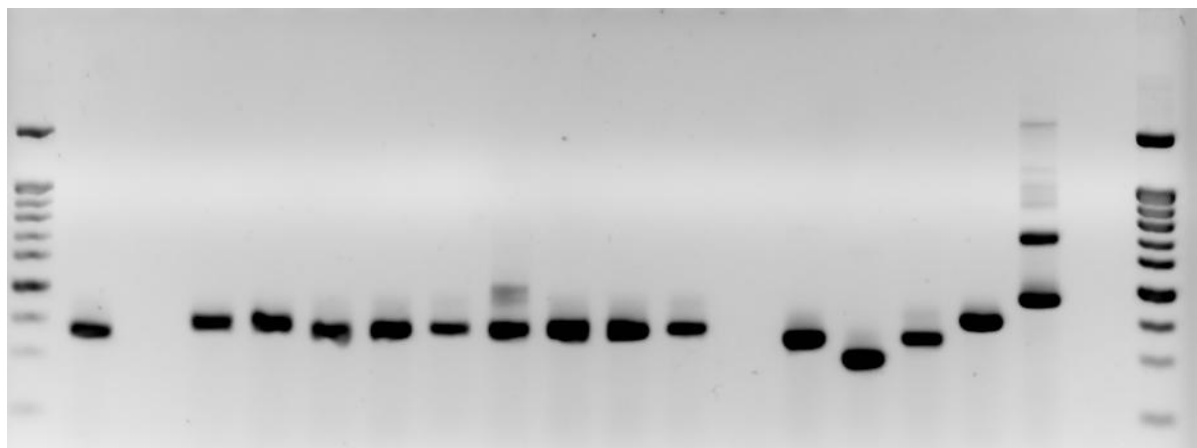


Abb. 4-26: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P40M1F-P42V1D und P36R1A-P38R1A

Marker 100bp
P38R1B
P38R1C
P39R1A
P39R1B
P39R1C
P39R1D
P39R1E
P39R1F
P39V1A
P39V1B
Lb 3
Lb 13
Lb 9
Lb 27
Neg.Kontr.
Marker 100bp

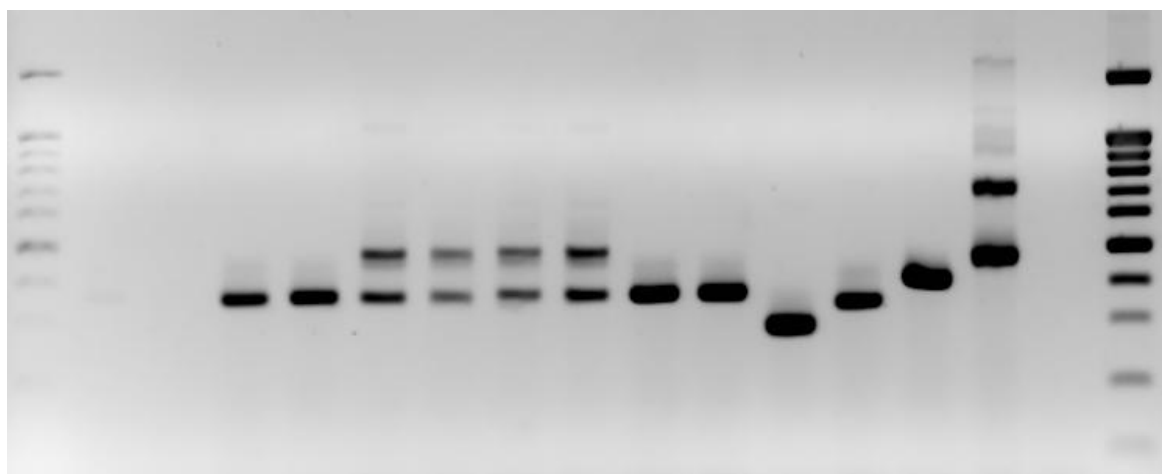


Abb. 4-27: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P38R1B-P39V1B

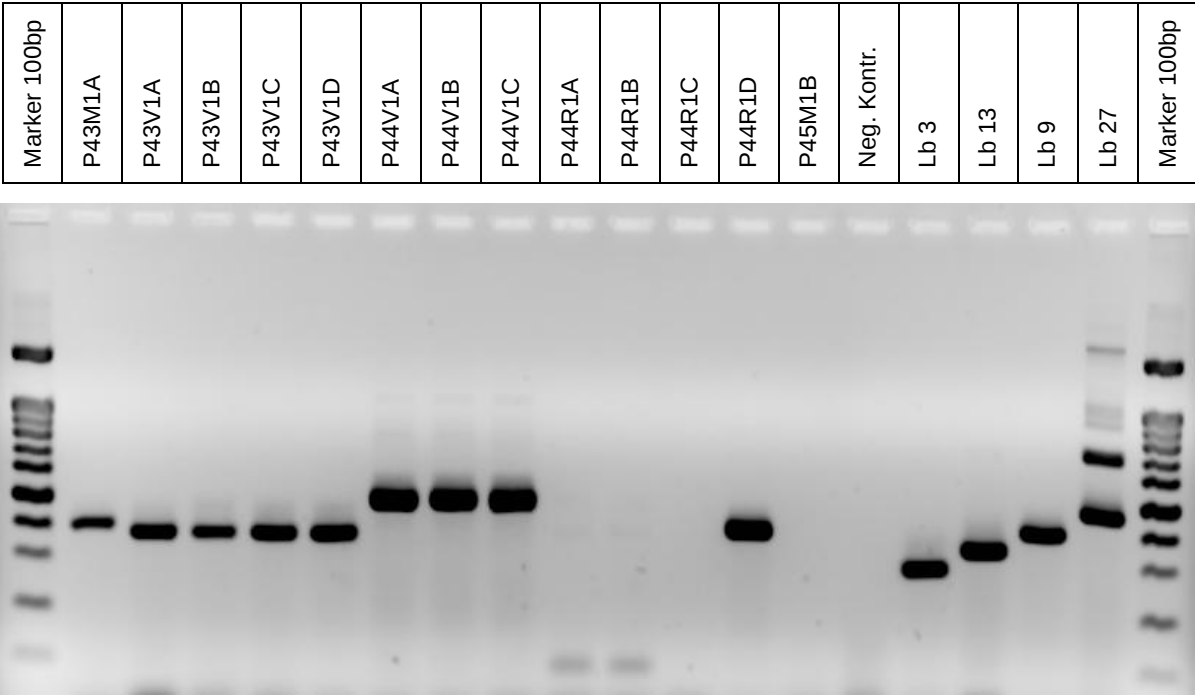


Abb. 4-28: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P43M1A-P45M1B

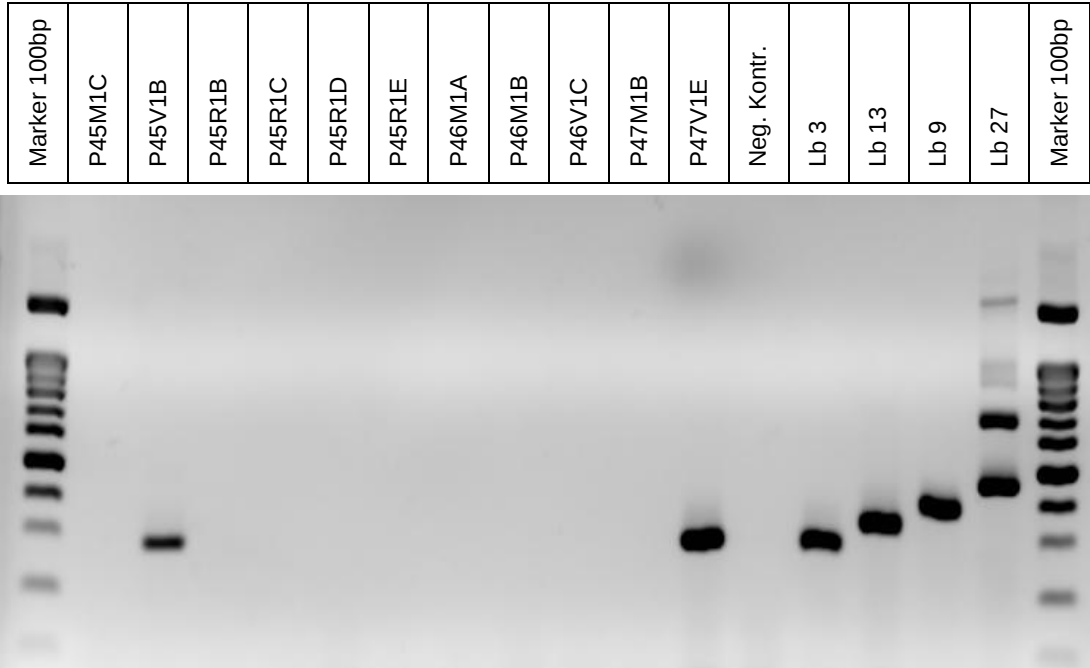


Abb. 4-29: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P45M1C-P47V1E

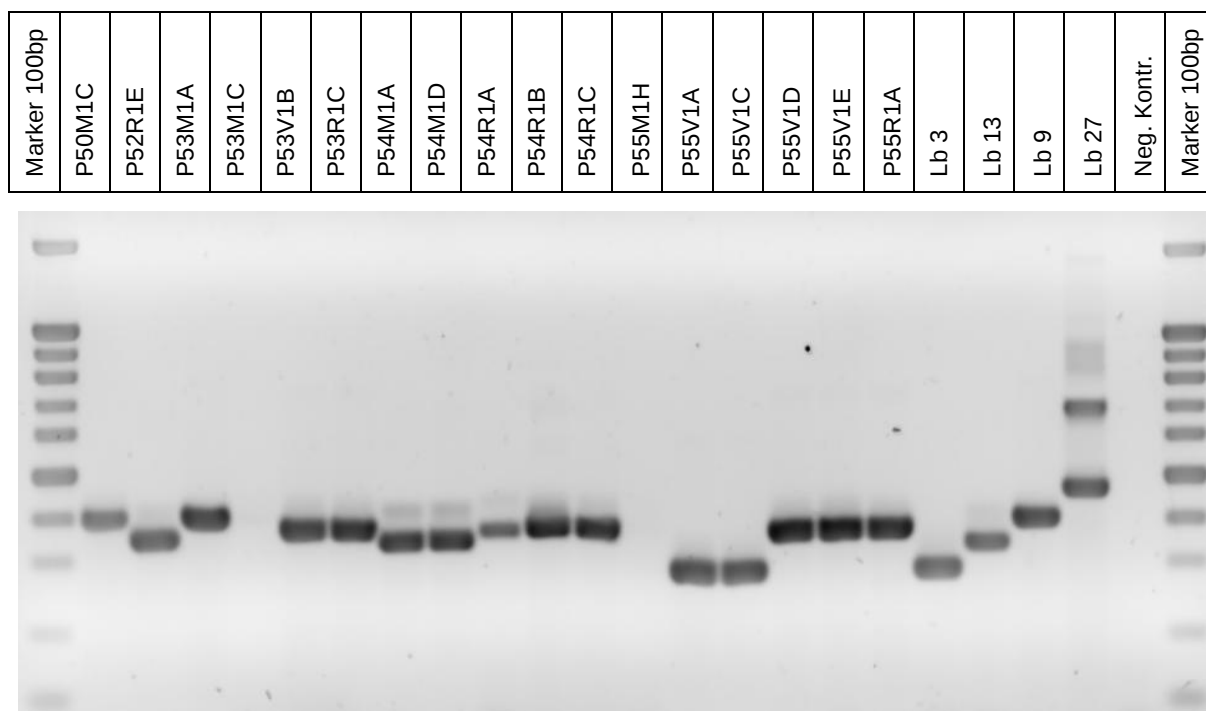


Abb. 4-30: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P50M1C-P55R1A

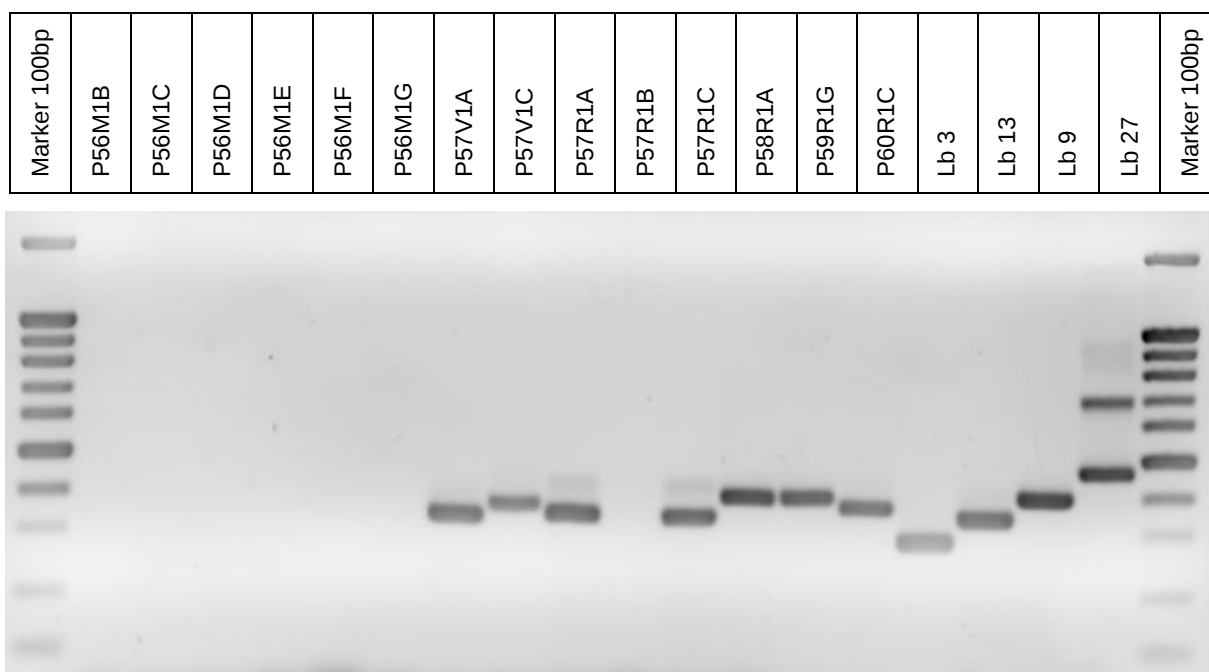


Abb. 4-31: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P56M1B-P60R1C

Bei der Multiplex-PCR konnten 84 positive Isolate ermittelt werden. Davon wurden 3 der Gruppe I (450 bp und 700 bp) zugeordnet, 9 der Gruppe II (300 bp), 53 der Gruppe III (400 bp) und 19 der Gruppe IV (350 bp).

Da bei manchen Banden nur sehr schwer zwischen Gruppe III und Gruppe IV unterschieden werden konnte, wurden die Isolate in weiterer Folge bei beiden Gruppen weiter untersucht.

33 Isolate wurden als negativ klassifiziert, konnten also zu keiner der Lactobacillenarten zugeordnet werden. Diese negativen Isolate wurden in weiterer Folge durch die Enterococcen-spezifische PCR bzw. mittels Sequenzierung identifiziert.

4.2.3. Art-spezifische Multiplex- PCR

Die Isolate, die ein positives Ergebnis zeigten wurden dann weiter in den folgenden Gruppen untersucht:

Gruppe II:

- Multiplex-PCR-II-1:
verwendete Primer: Laci-1, Ljen-3 und 23-10C
Positivkontrollen: *L. acidophilus* (Lb 1; 210 bp) und *L. jensenii* (Lb 99; 700 bp und 900 bp) [SONG, 2000]
- Multiplex-PCR-II-2:
verwendete Primer: Lcri-3 und Lcri-2, Lgas-3 und Lgas-2
Positivkontrollen: *L. crispatus* (Lb 6; 500 bp) und *L. gasseri* (Lb 3; 360 bp) [SONG, 2000]

Gruppe III:

- Multiplex-PCR-III:
verwendete Primer: LU-5 und Lpar-4/Rhall
Positivkontrollen: *L. paracasei* (Lb 9; 300 bp) und *L. rhamnosus* (Lb 197; 100 bp) [SONG, 2000]

Gruppe IV:

- Multiplex-PCR-IV:

verwendete Primer: Lsal-1 und Lsal-2, Lreu-1 und Lreu-4, Lpla-3 und Lpla-2, Lfer-3 und Lfer-4

Positivkontrollen: *L. salivarius* (Lb 101; 410 bp), *L. reuteri* (Lb 13; 300 bp), *L. plantarum* (Lb 23; 250 bp) und *L. fermentum* (Lb 188; 190 bp) [SONG, 2000]

Die Positivkontrollen der Gruppe IV machten einige Probleme, weshalb diese Versuchsreihe nicht besonders aussagekräftig ist. Der Großteil der Isolate, die in Gruppe IV fielen, wurde zusätzlich noch sequenziert.

Gruppe I:

Da in der Gruppe I nur Lactobacillen der Art *L. delbrueckii* vorkommen, mussten jene Isolate, die bei der Multiplex-PCR ein positives Ergebnis auf Gruppe I lieferten (bei 450 bp und 700 bp), nicht mehr weiter untersucht werden.

Ergebnisse der Gruppe I:

- *L. delbrueckii*: P33R1B, P33R1C (sehr schwach), P34M1A

Gruppe II:

Die Isolate, die bei 300 bp eine Bande aufwiesen wurden in dieser Gruppe weiter untersucht. Diese Gruppe wurde weiter unterteilt in Gruppe II-1 und Gruppe II-2. Die hier verwendeten Positivkontrollen waren *L. acidophilus* (Lb 1; 210 bp) und *L. jensenii* (Lb 99; 700 bp und 900 bp) für Gruppe II-1 und *L. gasseri* (Lb 3; 360 bp) und *L. crispatus* (Lb 6; 520 bp und 800 bp) für Gruppe II-2.

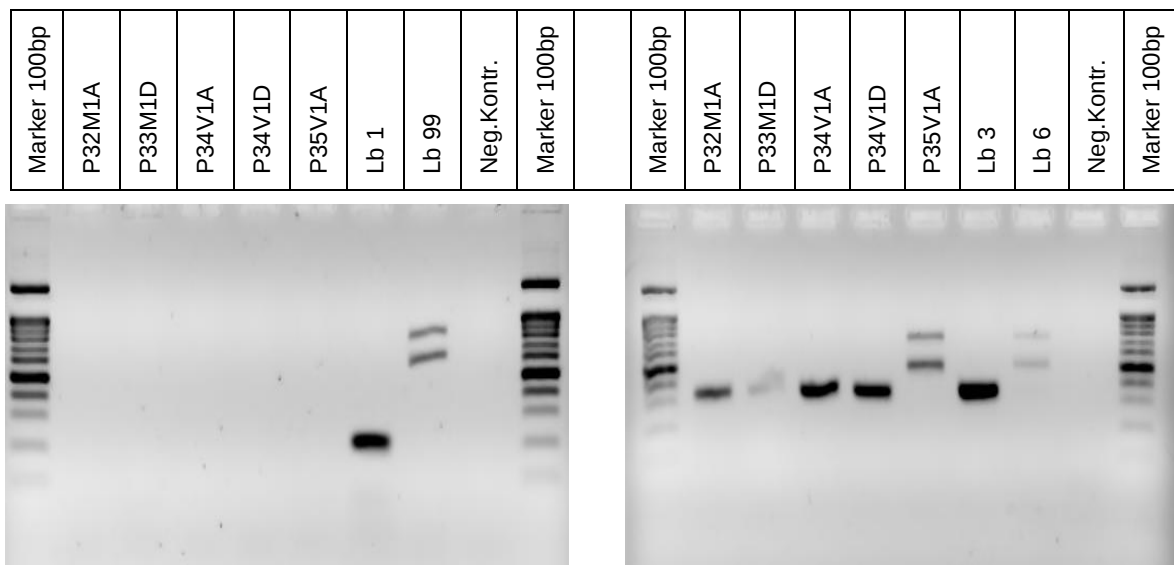


Abb. 4-32: Art-spezifische Multiplex-PCR II-1 und II-2 der kulturellen Isolate P32M1A-P35V1A

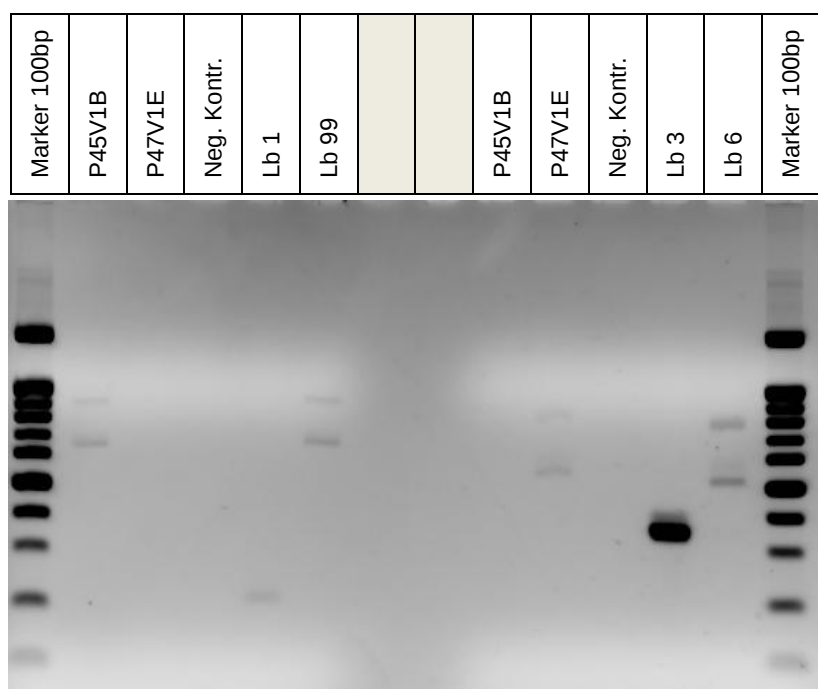


Abb. 4-33: Art-spezifische Multiplex-PCR II der kulturellen Isolate P45V1B und P47V1E

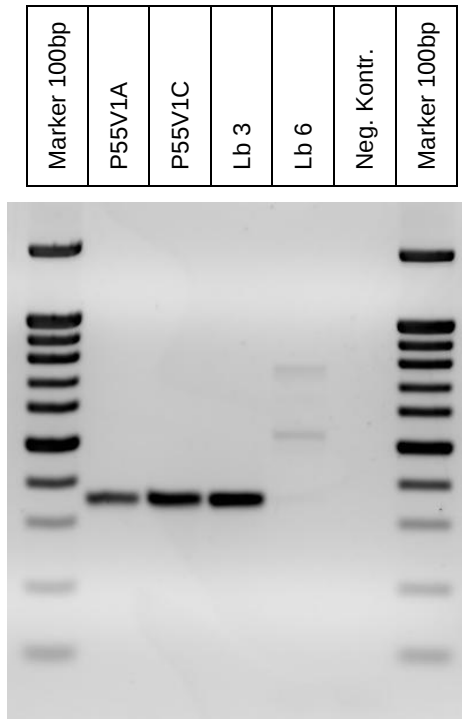


Abb. 4-34: Art-spezifische Multiplex-PCR II der kulturellen Isolate P55V1A und P55V1C

Da durch die Art-spezifische Multiplex-PCR II-2 das Ergebnis schon eindeutig war, wurde die Art-spezifische Multiplex-PCR II-1 nicht durchgeführt.

Ergebnisse der Gruppe II:

- *L. gasseri*: P32M1A, P33M1D, P34V1A, P34V1D, P55V1A, P55V1C
- *L. crispatus*: P35V1A, P47V1E
- *L. jensenii*: P45V1B
- *L. acidophilus*: keine Isolate

Gruppe III:

Die Isolate, die bei 400 bp eine Bande aufwiesen fielen in Gruppe III und wurden dort genauer weiter untersucht. Die hier verwendeten Positivkontrollen waren *L. paracasei* (Lb 9; 300 bp) und *L. rhamnosus* (Lb 197; 100 bp)

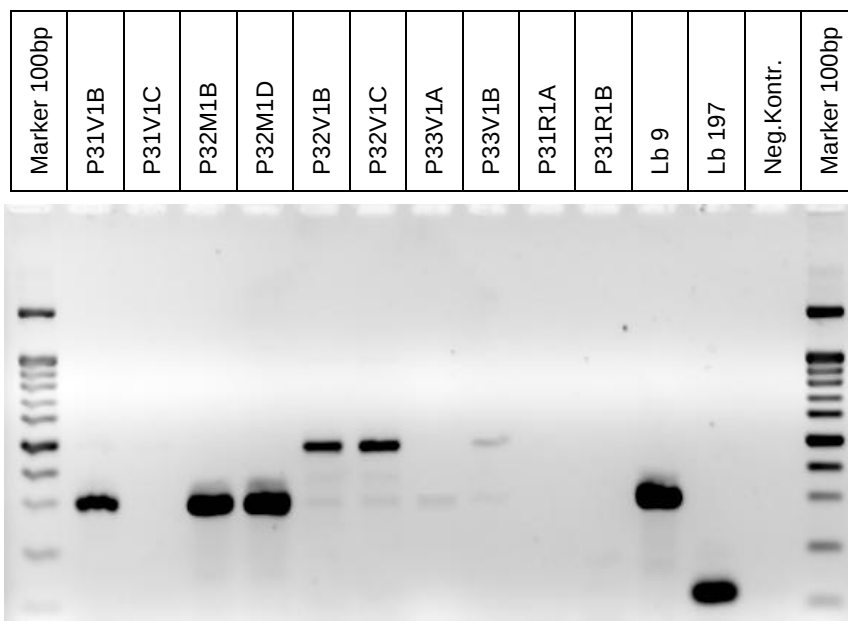


Abb. 4-35: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P31V1B-P33V1B

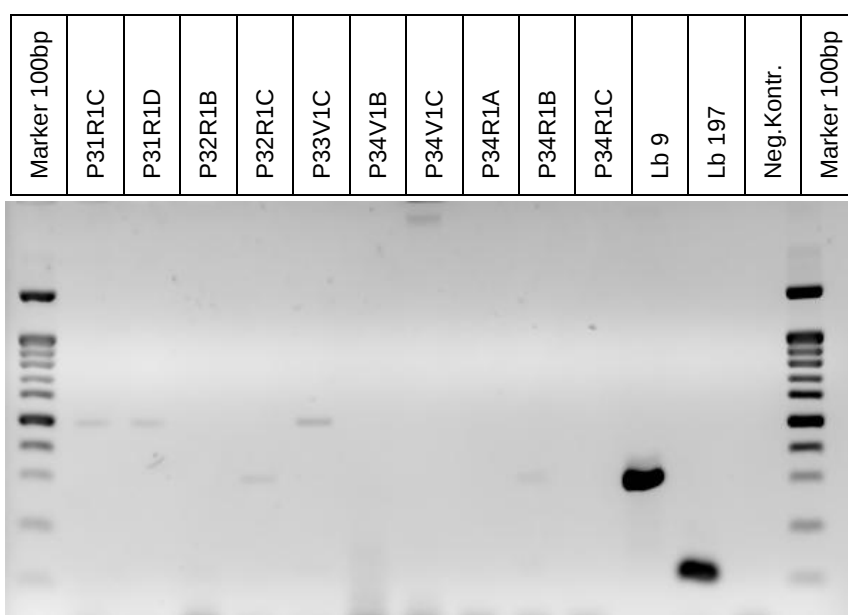


Abb. 4-36: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P31R1C-P34R1C

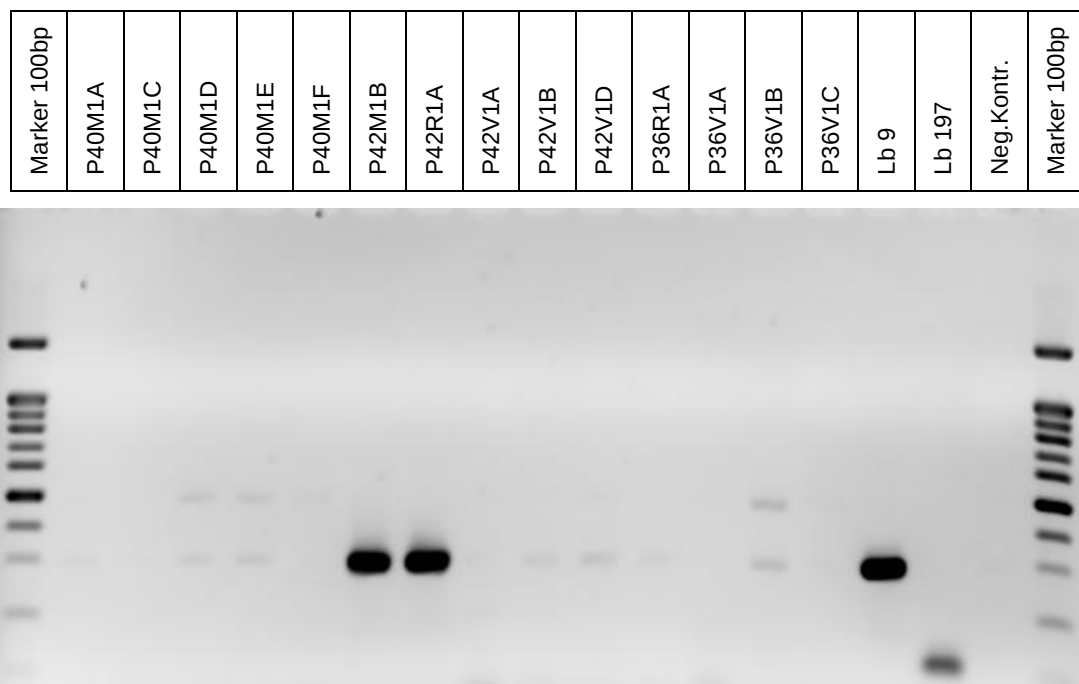


Abb. 4-37: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P40M1A-P42V1D und P36V1A-P36R1A

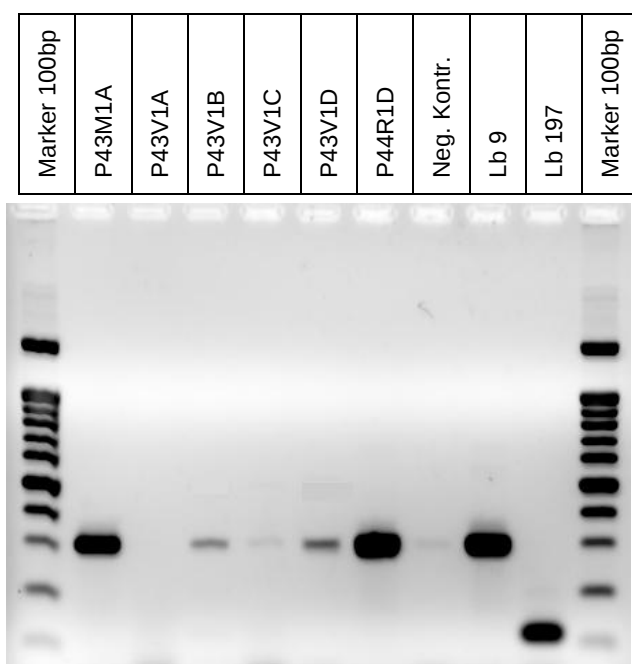


Abb. 4-38: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P43M1A-P44R1D

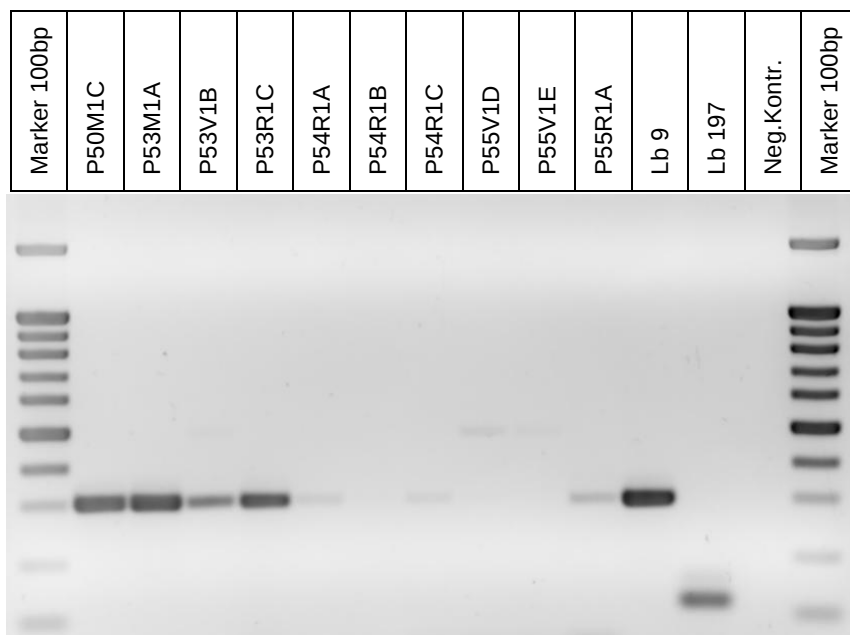


Abb. 4-39: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P50M1C-P55R1A

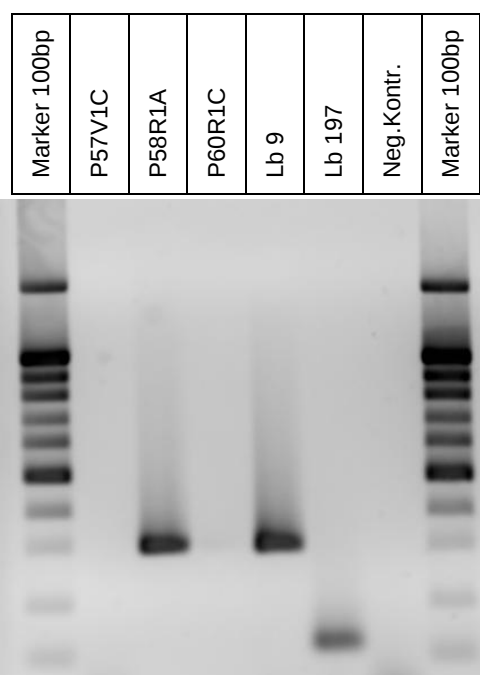


Abb. 4-40: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P57V1C-P60R1C

Ergebnisse der Gruppe III:

- *L. paracasei*: P31V1B, P32M1B, P32M1D, P33V1A, P32R1C, P34R1B, P42M1B, P42R1A, P43M1A, P43V1B, P43V1C, P43V1D, P44R1D, P50M1C, P53M1A, P53V1B, P53R1C, P54R1A, P54R1C, P55R1A, P58R1A
- *L. rhamnosus*: /
- keine Zuordnung: P31V1C, P32V1B, P32V1C, P33V1B, P31R1A, P31R1B, P31R1C, P31R1D, P32R1B, P33V1C, P34V1B, P34V1C, P34R1A, P34R1C, P40M1A, P40M1C, P40M1D, P40M1E, P40M1F, P42V1A, P42V1B, P42V1D, P36R1A, P36V1A, P36V1B, P36V1C, P43V1A, P54R1B, P55V1D, P55V1E, P57V1C, P60R1C

Gruppe IV:

Die Isolate, die bei 350 bp eine Bande aufwiesen fielen in Gruppe IV und wurden dort genauer weiter untersucht. Die hier verwendeten Positivkontrollen waren *L. salivarius* (Lb 101; 410 bp), *L. plantarum* (Lb 23; 250 bp und 900 bp), *L. reuteri* (Lb 13; 300 bp) und *L. fermentum* (Lb 188; 190 bp).

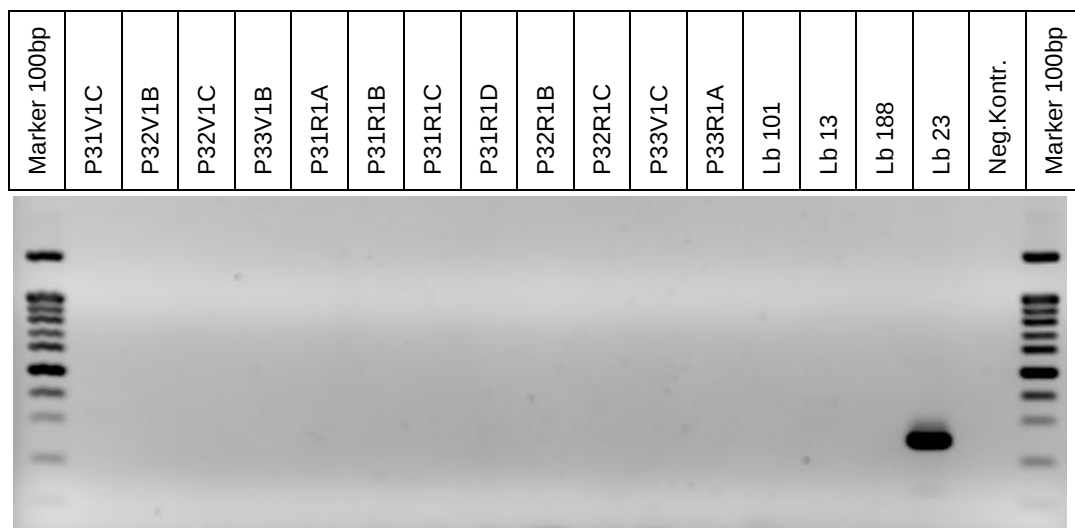


Abb. 4-41: Art-spezifische Multiplex-PCR IV der kulturellen Isolate P31V1C-P33R1A

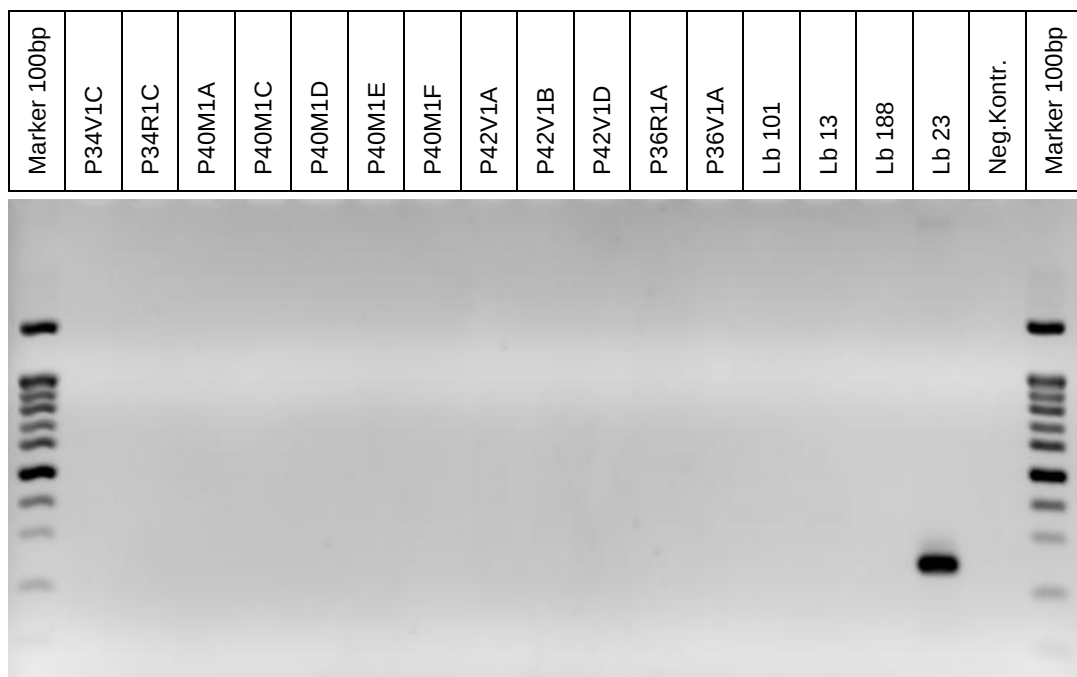


Abb. 4-42: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P34V1C-P42V1D

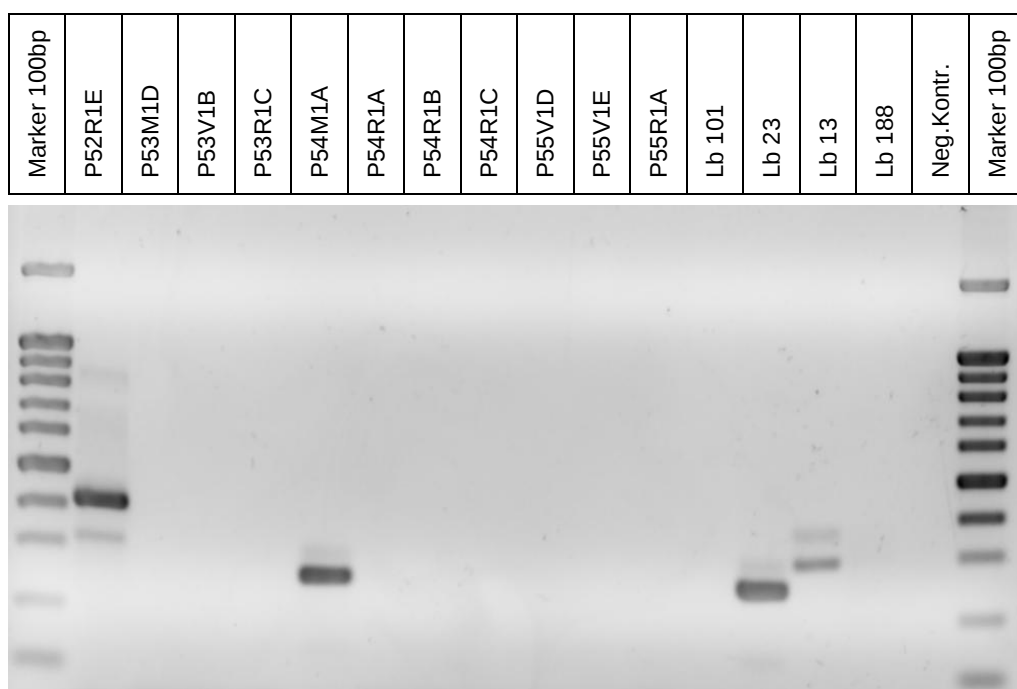


Abb. 4-43: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P52R1E-P55R1A

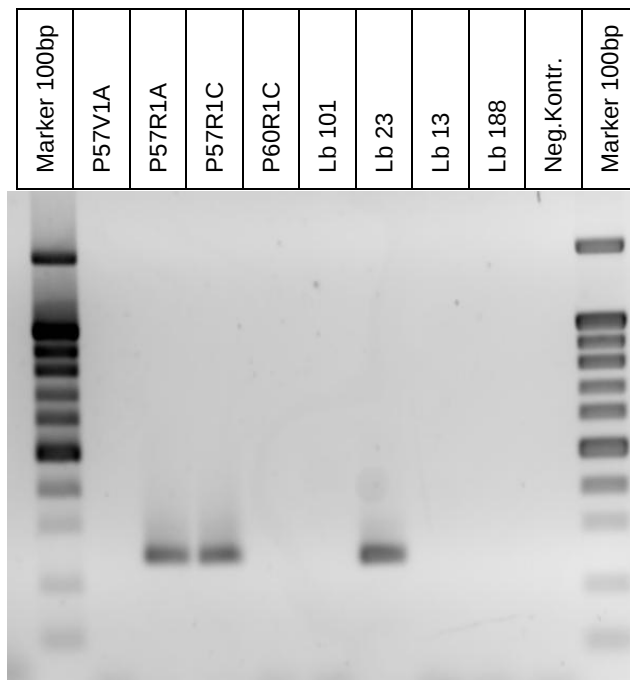


Abb. 4-44: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P57V1A-P60R1C

Ergebnisse der Gruppe IV:

Schon bei der ersten Abbildung zeigt sich hier deutlich, dass nur eine der vier Positivkontrollen ein positives Ergebnis lieferte. Aufgrund dieser Tatsache dienten die Gele der Gruppe IV nicht der Auswertung.

Durch Sequenzierung und eine weiterführende Enterococcen-spezifische PCR konnte jedoch eine Identifizierung erfolgen.

Durch Sequenzierung konnten einige Isolate der Gruppe IV zugeordnet werden:

- *L. fermentum*: P38R1A, P57V1A
- *L. plantarum*: P40M1A, P43V1A, P54M1A, P54M1D, P57R1A, P57R1C
- *L. salivarius*: P52R1E

Bei den restlichen Isolaten handelte es sich nicht um Lactobacillen. Dieses Ergebnis zeigte allerdings auch, dass diese Multiplex-PCR nicht nur Lactobacillen erfasst.

Nachfolgend finden sich die zusammengefassten Ergebnisse der Isolate des 1. Abstriches. Wie häufig eine einzelne *Lactobacillus*-Art nachgewiesen werden konnte ist in Tabelle 4-2 und Abbildung 4-45 zu sehen. Hierbei wurde jedes Isolat, das als die gleiche Art identifiziert werden konnte, mitgezählt.

Tab. 4-2: Alle identifizierten Isolate der Keimzahlbestimmung

	Oral	Rektal	Vaginal	Gesamt
<i>L. paracasei</i>	6	9	6	21
<i>L. gasseri</i>	2	0	4	6
<i>L. crispatus</i>	0	0	2	2
<i>L. plantarum</i>	3	2	1	6
<i>L. fermentum</i>	0	1	1	2
<i>L. jensenii</i>	0	0	1	1
<i>L. delbrueckii</i>	1	2	0	3
<i>L. sakei</i>	1	0	0	1
<i>L. viridescens</i>	1	0	0	1
<i>L. oris</i>	0	1	0	1
<i>L. salivarius</i>	0	1	0	1
<i>L. casei</i>	0	1	0	1
Summe	14	17	15	46

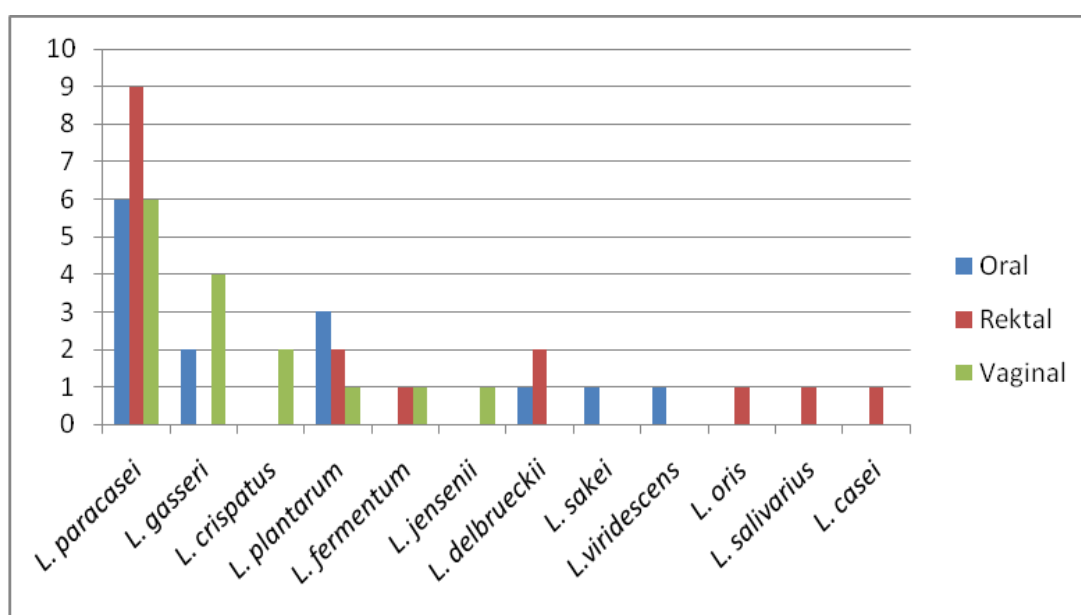


Abb. 4-45: Verteilung der identifizierten Isolate auf die einzelnen Arten.

Es zeigt sich hier deutlich, dass *L. paracasei* die dominierende Art unter den kulturellen Isolaten ist, gefolgt von *L. plantarum* und *L. gasseri* und an dritter Stelle *L. delbrueckii*. Weitere Arten sind *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. viridescens*, *L. sakei*, *L. jensenii*, *L. oris* und *L. salivarius*. Die anderen in der Grafik aufgeführten Lactobacillen kamen bei diesen Isolaten nicht vor, wurden aber deswegen auch aufgeführt, da sie bei den schwangeren Probandinnen eine Rolle spielten.

Der Vollständigkeit halber wurde auch eine Grafik erstellt, die die Verteilung zeigt, wenn mehrere Isolate eines Abstriches als die gleiche Art identifiziert wurden, aber nur einmal mitgezählt wurden (siehe Tabelle 4-3 und Abb. 4-46):

Tab. 4-3: Alle identifizierten Isolate der Keimzahlbestimmung (keine Mehrfachzählung pro Keimzahlbestimmung)

	Oral	Rektal	Vaginal	Gesamt
<i>L. paracasei</i>	5	8	4	17
<i>L. gasseri</i>	2	0	2	4
<i>L. crispatus</i>	0	0	2	2
<i>L. plantarum</i>	2	1	1	4
<i>L. fermentum</i>	0	1	1	2
<i>L. jensenii</i>	0	0	1	1
<i>L. delbrueckii</i>	1	1	0	2
<i>L. sakei</i>	1	0	0	1
<i>L. viridescens</i>	1	0	0	1
<i>L. oris</i>	0	1	0	1
<i>L. salivarius</i>	0	1	0	1
<i>L. casei</i>	0	1	0	1
Summe	12	14	11	37

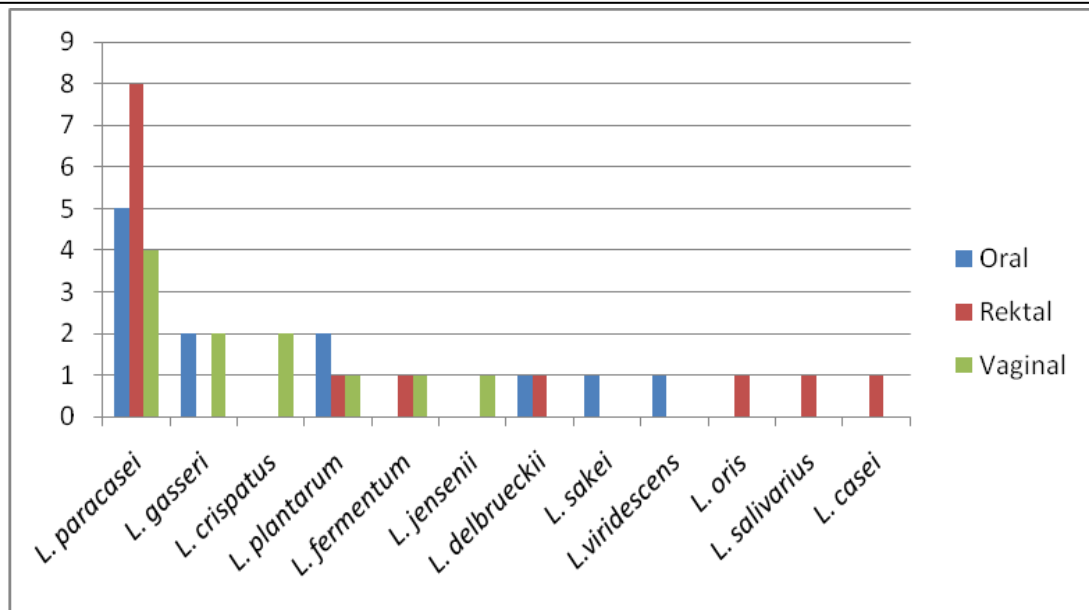


Abb. 4-46: Verteilung der identifizierten Isolate auf die einzelnen Arten, jede Art pro Abstrich nur 1x berücksichtigt.

Die folgenden Tabellen zeigen nun noch die dominierenden Arten des jeweiligen Habitats.

Orale Isolate:

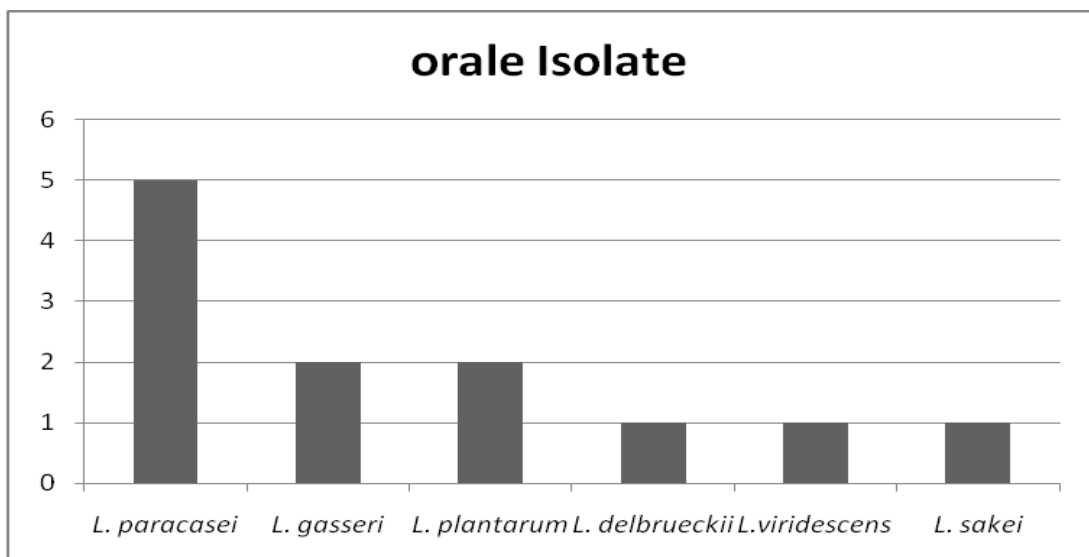


Abb. 4-47: Verteilung der identifizierten oralen Isolate auf die einzelnen Arten.

Bei den oralen Isolaten wurde am häufigsten *L. paracasei* identifiziert, gefolgt von *L. plantarum* und *L. gasseri*. Weiters konnten noch *L. delbrueckii*, *L. viridescens* und *L. sakei* nachgewiesen werden.

Rektale Isolate:

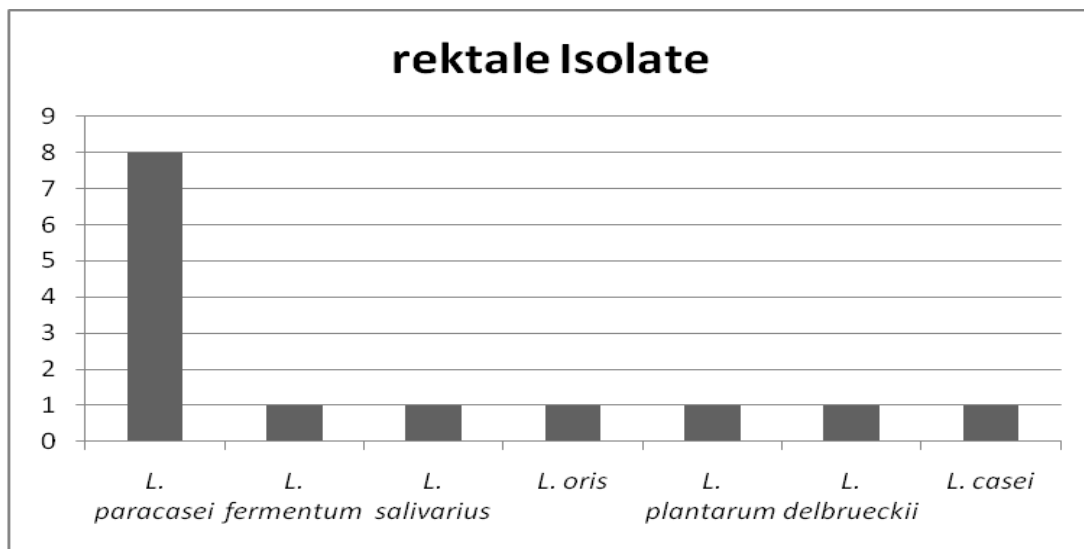


Abb. 4-48: Verteilung der identifizierten rektalen Isolate auf die einzelnen Arten.

Bei den Isolaten des Rektalabstrichs wurde am häufigsten *L. paracasei* identifiziert, weiters folgen *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. oris*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* und *L. casei*.

Vaginale Isolate:

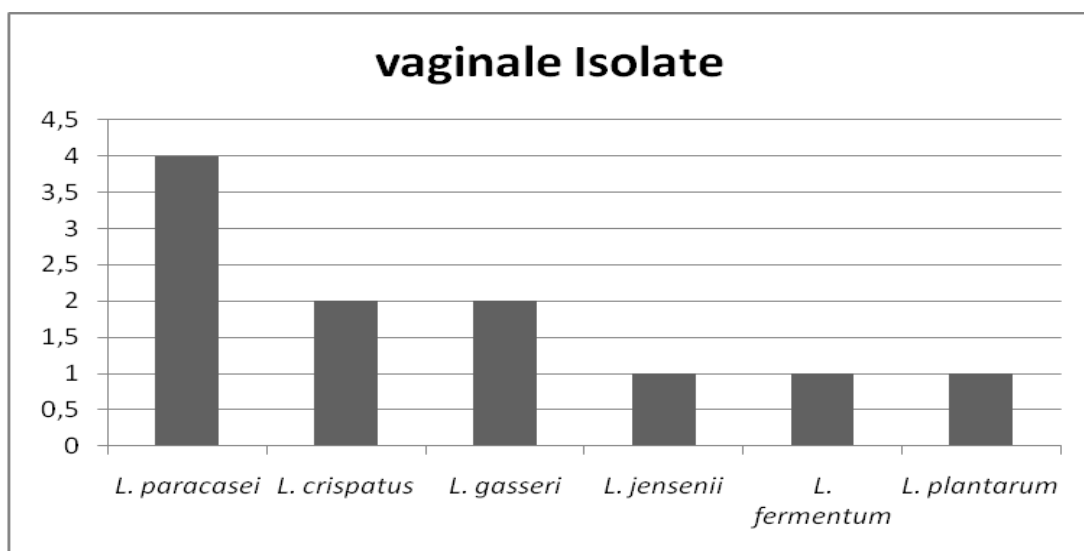


Abb. 4-49: Verteilung der identifizierten vaginalen Isolate auf die einzelnen Arten.

Wie in Abb. 4-49 gezeigt wird, dominiert bei den vaginalen Lactobacillen *L. paracasei*. Es folgen *L. crispatus* und *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. fermentum* und *L. plantarum*.

4.2.4. Sequenzierungsergebnisse

Jene Isolate, die letztendlich nicht mittels art-spezifischer Multiplex-PCR identifiziert werden konnten, wurden zum Sequenzieren an die Firma Eurofins MWG/Operon, Deutschland geschickt. Es wurde dafür nochmals eine Gattungsspezifische PCR mit den Primern Lac 1-f und Lac 2-r [WALTER, 2001] durchgeführt, das PCR Produkt anschließend aufgereinigt und an die Firma geschickt. Die Ergebnisse konnten unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> überprüft werden.

In der nachfolgenden Tabelle finden sich die Sequenzierungsergebnisse.

Tab. 4-4: Sequenzierungsergebnisse

Probe	Ergebnis	Übereinstimmung %
P31M1A	<i>Streptococcus mitis</i>	99%
P31V1C	<i>E. faecalis</i>	100%
P31R1A	<i>E. durans</i>	99%
P31R1D	<i>E. faecalis</i>	100%
P32V1B	<i>E. faecalis</i>	100%
P32V1C	<i>E. faecalis</i>	100%
P32R1B	<i>L. paracasei</i>	98%
P33M1A	<i>Streptococcus mutans</i>	99%
P33V1C	<i>E. faecalis</i>	100%
P33R1A	<i>L. oris</i>	99%
P34V1C	<i>E. faecium</i>	100%
P34R1C	<i>E. hirae</i>	98%
P36V1A	<i>E. faecalis</i>	100%
P36V1B	<i>E. faecalis</i>	100%
P36V1C	<i>E. faecalis</i>	100%
P37V1A	<i>Streptococcus anginosus</i>	100%
P38R1A	<i>L. fermentum</i>	100%
P39R1F	<i>L. casei</i>	98%
P40M1A	<i>L. plantarum</i>	99%
P40M1C	<i>E. faecalis</i>	99%
P40M1D	<i>E. faecalis</i>	100%
P40M1E	<i>E. faecalis</i>	100%
P40M1F	<i>E. faecalis</i>	100%
P41R1A	<i>Streptococcus agalactiae</i>	99%

Probe	Ergebnis	Übereinstimmung %
P42V1A	<i>E. faecalis</i>	100%
P43V1A	<i>L. plantarum</i>	99%
P44V1A	<i>E. faecium</i>	99%
P44V1B	<i>E. faecium</i>	99%
P44V1C	<i>E. faecium</i>	99%
P47M1B	<i>Streptococcus sanguinis</i>	98%
P48M1A	<i>Streptococcus sobrinus</i>	99%
P49M1A	<i>Streptococcus mutans</i>	100%
P49V1A	<i>E. faecalis</i>	100%
P49R1A	<i>Streptococcus anginosus</i>	99%
P50V1A	<i>Actinomyces neuui</i>	99%
P51M1A	<i>Streptococcus crispatus</i>	99%
P51V1A	<i>E. coli</i>	100%
P51R1A	<i>Streptococcus anginosus</i>	100%
P52M1A	<i>Streptococcus mutans</i>	100%
P52V1C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%
P52R1E	<i>L. salivarius</i>	99%
P53V1A	<i>E. faecalis</i>	100%
P54M1A	<i>L. plantarum</i>	99%
P54R1B	<i>E. avium</i>	100%
P55M1A	<i>Streptococcus mitis</i>	99%
P55V1D	<i>E. faecalis</i>	98%
P55V1E	<i>E. faecalis</i>	99%
P56M1B	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99%
P56M1C	<i>L. sakei</i>	98%
P56M1D	<i>L. viridescens</i>	98%
P56M1E	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99%
P56M1F	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99%
P56M1G	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99%
P56V1A	<i>E. faecalis</i>	100%
P56R1A	<i>Lactococcus lactis</i>	100%
P57M1A	<i>Streptococcus mitis</i>	98%
P57V1A	<i>L. fermentum</i>	99%
P57V1B	<i>E. faecalis</i>	100%
P57V1C	<i>E. faecalis</i>	99%
P58M1C	<i>Streptococcus mitis</i>	99%
P58V1A	<i>Streptococcus agalactiae</i>	99%
P60M1A	<i>Streptococcus salivarius</i>	99%
P60R1C	<i>E. faecalis</i>	99%

Wie sich hier deutlich zeigt, handelte es sich bei dem Großteil der sequenzierten Proben nicht um Lactobacillen. Am häufigsten konnten Enterococcen nachgewiesen werden.

Da so viele Isolate negativ auf Lactobacillen getestet wurden, wurde anschließend noch eine Enterococcen-spezifische, sowie eine Multiplex-PCR für *E. faecium* und *E. faecalis* durchgeführt.

In der nachfolgenden Tabelle 4-5 finden sich die Isolate, die als Enterococcen identifiziert werden konnten.

Tab. 4-5: Übersicht über die als Enterococcen identifizierten Isolate.

Probe	Ergebnis
P31M1B	<i>Enterococcus</i> ssp.
P31M1D	<i>Enterococcus</i> ssp.
P31V1A	<i>E. faecalis</i>
P31V1C	<i>E. faecalis</i>
P31R1A	<i>E. durans</i>
P31R1B	<i>Enterococcus</i> ssp.
P31R1C	<i>E. faecalis</i>
P31R1D	<i>E. faecalis</i>
P32V1A	<i>E. faecalis</i>
P32V1B	<i>E. faecalis</i>
P32V1C	<i>E. faecalis</i>
P32R1A	<i>E. faecium</i>
P33V1B	<i>E. faecalis</i>
P33V1C	<i>E. faecalis</i>
P33R1D	<i>E. faecium</i>
P33R1E	<i>Enterococcus</i> ssp.
P34M1B	<i>Enterococcus</i> ssp.
P34V1B	<i>Enterococcus</i> ssp.
P34V1C	<i>E. faecium</i>
P34R1A	<i>Enterococcus</i> ssp.
P34R1C	<i>E. hirae</i>
P36V1A	<i>E. faecalis</i>
P36V1B	<i>E. faecalis</i>
P36V1C	<i>E. faecalis</i>
P36R1A	<i>E. faecium</i>
P36R1B	<i>Enterococcus</i> ssp.
P36R1C	<i>E. faecalis</i>

Probe	Ergebnis
P36R1D	<i>E. faecalis</i>
P36R1E	<i>E. faecalis</i>
P38R1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P38R1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P38R1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P39V1A	<i>Enterococcus ssp.</i>
P39V1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P39R1A	<i>Enterococcus ssp.</i>
P39R1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P39R1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P39R1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P39R1E	<i>Enterococcus ssp.</i>
P40M1C	<i>E. faecalis</i>
P40M1D	<i>E. faecalis</i>
P40M1E	<i>E. faecalis</i>
P40M1F	<i>E. faecalis</i>
P42V1A	<i>E. faecalis</i>
P42V1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P42V1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P42V1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P42R1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P42R1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P42R1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P42R1E	<i>Enterococcus ssp.</i>
P44V1A	<i>E. faecium</i>
P44V1B	<i>E. faecium</i>
P44V1C	<i>E. faecium</i>
P44R1A	<i>Enterococcus ssp.</i>
P44R1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P45M1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P45R1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P45R1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P45R1E	<i>Enterococcus ssp.</i>
P46M1A	<i>Enterococcus ssp.</i>
P46M1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P48M1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P48M1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P48M1F	<i>Enterococcus ssp.</i>
P48V1C	<i>Enterococcus ssp.</i>

Probe	Ergebnis
P48V1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P48V1E	<i>Enterococcus ssp.</i>
P48R1A	<i>Enterococcus ssp.</i>
P48R1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P48R1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P49M1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P49M1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P49M1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P49M1E	<i>Enterococcus ssp.</i>
P49M1F	<i>Enterococcus ssp.</i>
P49V1A	<i>E. faecalis</i>
P49V1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P49V1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P49V1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P49V1E	<i>Enterococcus ssp.</i>
P49V1F	<i>Enterococcus ssp.</i>
P50M1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P50V1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P50V1E	<i>Enterococcus ssp.</i>
P50R1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P51V1E	<i>Enterococcus ssp.</i>
P51R1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P51R1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P51R1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P52M1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P52M1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P52M1F	<i>Enterococcus ssp.</i>
P52R1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P52R1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P53M1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P53M1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P53V1A	<i>E. faecalis</i>
P53V1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P53R1A	<i>Enterococcus ssp.</i>
P53R1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P54R1B	<i>E. avium</i>
P54R1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P54R1E	<i>Enterococcus ssp.</i>
P55V1B	<i>Enterococcus ssp.</i>

Probe	Ergebnis
P55V1D	<i>E. faecalis</i>
P55V1E	<i>E. faecalis</i>
P55R1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P55R1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P55R1F	<i>Enterococcus ssp.</i>
P56V1A	<i>E. faecalis</i>
P56V1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P56V1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P56V1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P56R1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P56R1E	<i>Enterococcus ssp.</i>
P56R1F	<i>Enterococcus ssp.</i>
P57M1G	<i>Enterococcus ssp.</i>
P57V1B	<i>E. faecalis</i>
P57V1C	<i>E. faecalis</i>
P57V1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P57V1E	<i>Enterococcus ssp.</i>
P57V1F	<i>Enterococcus ssp.</i>
P58M1D	<i>Enterococcus ssp.</i>
P58M1E	<i>Enterococcus ssp.</i>
P58V1F	<i>Enterococcus ssp.</i>
P58R1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P58R1F	<i>Enterococcus ssp.</i>
P59R1B	<i>Enterococcus ssp.</i>
P60M1C	<i>Enterococcus ssp.</i>
P60M1F	<i>Enterococcus ssp.</i>
P60V1A	<i>E. faecalis</i>
P60R1A	<i>E. faecalis</i>
P60R1C	<i>E. faecalis</i>
P60R1G	<i>E. faecalis</i>

Die grau hinterlegten Probennummern wurden durch Sequenzierung identifiziert.

4.2.5. Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Mit der aus Abstrich 2 direkt isolierten DNA wurde nach Walter et al., 2001, mit den Primern Lac1-f und Lac2-rGC eine PCR durchgeführt. Das Produkt diente als Grundlage für die DGGE, die mit einem Gradienten von 35%- 55% bei 70 Volt und für 16 Stunden durchgeführt wurde. Um die Ergebnisse besser identifizieren zu können, wurde der Großteil der Banden aus dem Gel ausgeschnitten, anschließend eine PCR mit den Primern Lac1-f und Lac2-r [WALTER et al., 2001] durchgeführt und das mit dem PCRExtract Mini Kit von 5PRIME aufgereinigte PCR Produkt schließlich zum Sequenzieren an die Firma Eurofins MWG/Operon gesandt. Darauf folgte wieder die Auswertung der Ergebnisse unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>.

Der hierbei verwendete Marker setzte sich aus den folgenden *Lactobacillus*-Typstämmen zusammen:

Tab. 4-6: Typstämme, aus denen sich der Marker zusammensetzt.

Kürzel	<i>Lactobacillus</i> -Art
Lb 23	<i>L. plantarum</i>
Lb 5	<i>L. johnsonii</i>
Lb 3	<i>L. gasseri</i>
Lb 99	<i>L. jensenii</i>
Lb 6	<i>L. crispatus</i>
Lb 13	<i>L. reuteri</i>
Lb 197	<i>L. rhamnosus</i>

Folgender Marker wird bei
allen DGGE – Gelen
verwendet:

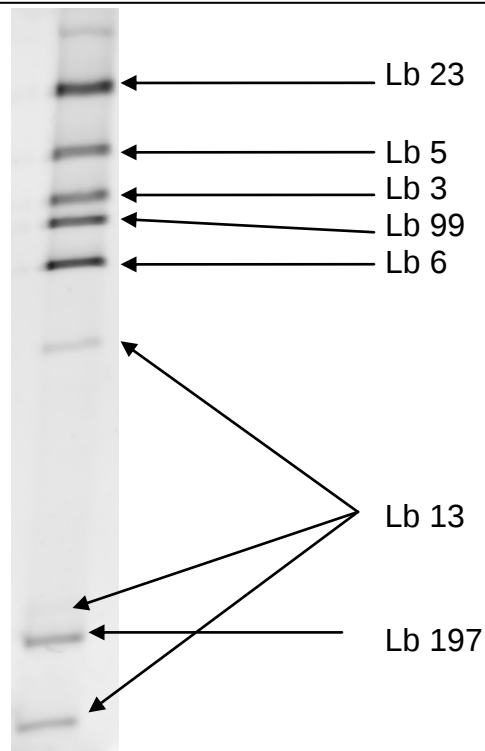


Abb. 4-50: DGGE-Marker aus Lactobacillus-Typstämmen.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der DGGE Gele. Jene mit einem Kreis und einer Nummer markierten Banden wurden ausgeschnitten und mittels Sequenzierung identifiziert. Die anderen Banden, gekennzeichnet mittels Buchstaben wurden dadurch klassifiziert, indem sie mit dem Marker als auch den sequenzierten Banden verglichen wurden. Die Ergebnisse werden in den Tabellen immer anschließend an die Abbildungen dargestellt.

Gel 1:

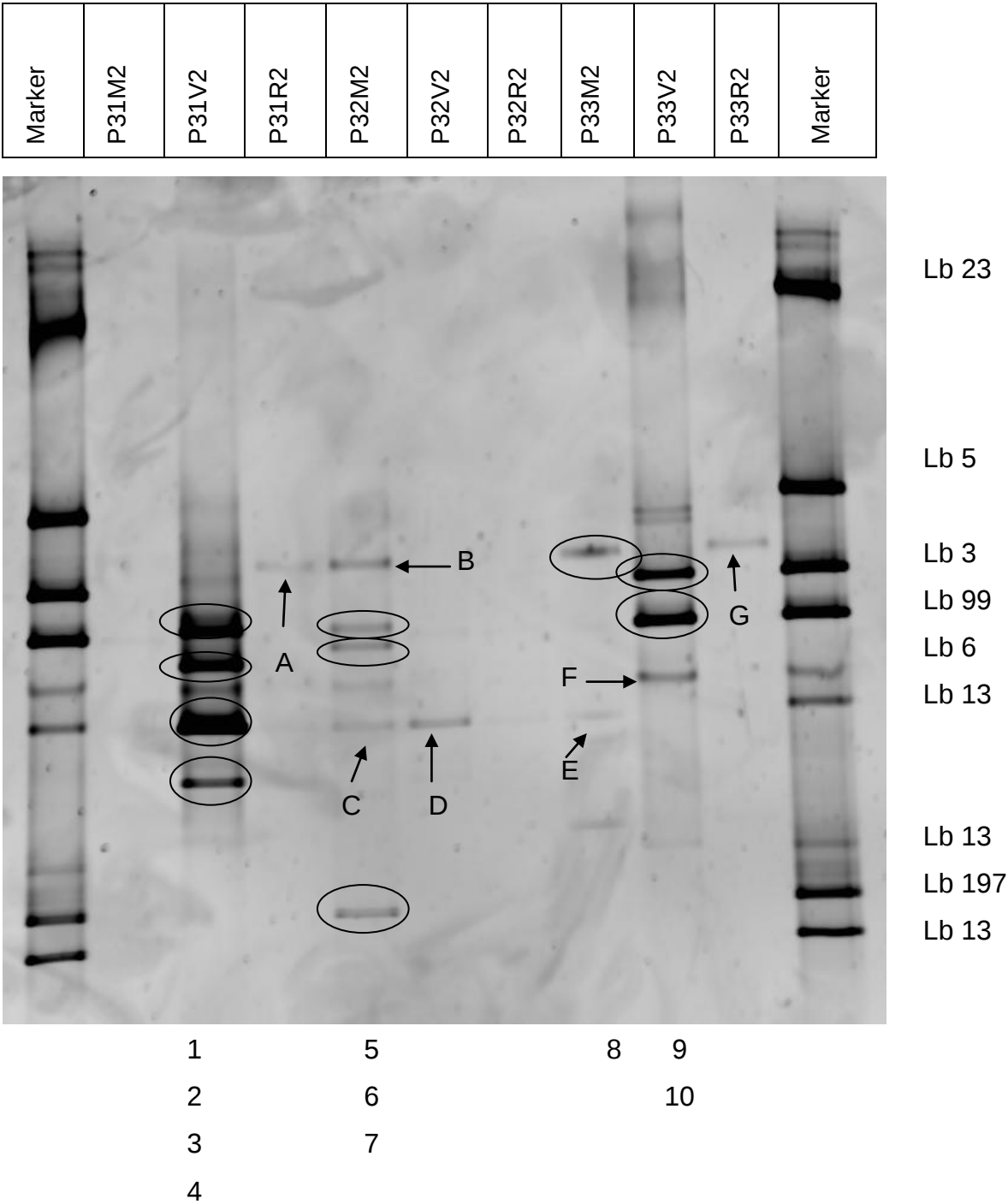


Abb. 4-51: DGGE-Gel 1 der Proben P31M2, P31V2, P31R2, P32M2, P32V2, P32R2, P33M2, P33V2 und P33R2.

Tab. 4-7: Sequenzierungsergebnisse von Gel 1

Probe	Nr.	Ergebnis	% Identity
P31V2	1	<i>L. iners</i>	99 %
	2		
	3		
	4		
P32M2	5	<i>L. fermentum</i>	100 %
	6	<i>L. salivarius</i>	99 %
	7	<i>L. casei/ L. paracasei</i>	98 %
P33M2	8	<i>L. gasseri/L. johnsonii</i>	99 %
P33V2	9	<i>L. jensenii</i>	99 %
	10	<i>L. helveticus/L. crispatus</i>	99 %

Bei der Sequenzierung war es nicht möglich zwischen den Arten *L. casei* und *L. paracasei*, sowie *L. gasseri* und *L. johnsonii* als auch *L. helveticus* und *L. crispatus* eindeutig zu unterscheiden. Deswegen werden immer beide Ergebnisse angegeben.

Tab. 4-8: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 1 und Marker

Probe	Bande	Ergebnis
P31R2	A	<i>L. gasseri/L. johnsonii</i>
P32M2	B	<i>L. gasseri/L. johnsonii</i>
	C	<i>L. reuteri</i>
P32V2	D	<i>L. reuteri</i>
P33M2	E	<i>L. reuteri</i>
P33V2	F	<i>L. crispatus</i>
P33R2	G	<i>L. gasseri/L. johnsonii</i>

P31M2, P32R2 und P33R2 lieferten keine verwertbaren Ergebnisse.

Gel 2:

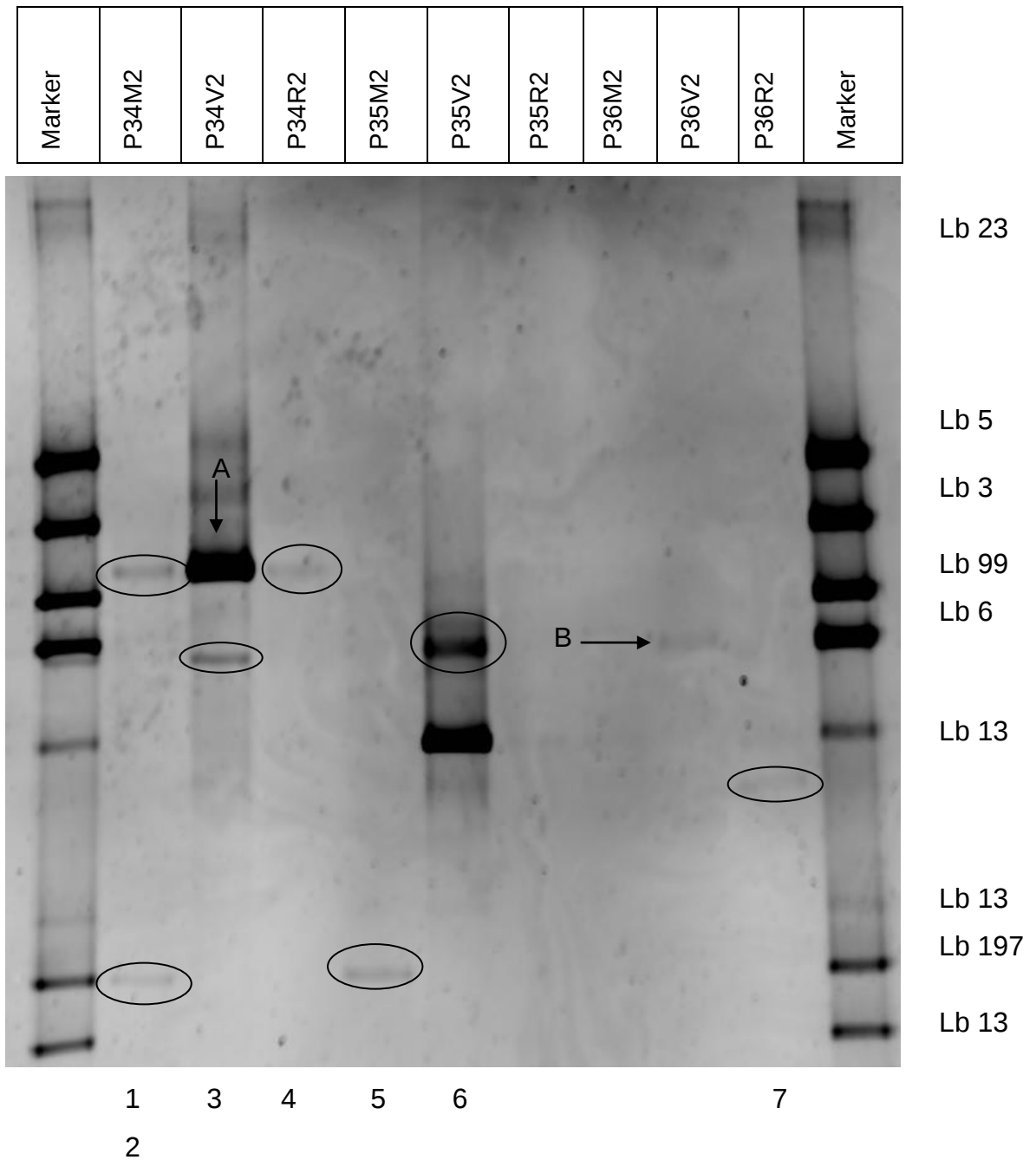


Abb. 4-52: DGGE-Gel 2 der Proben P34M2, P34V2, P34R2, P35M2, P35V2, P35R2, P36M2, P36V2 und P36R2.

Tab. 4-9: Sequenzierungsergebnisse von Gel 2

Probe	Nr.	Ergebnis	% Identity
P34M2	1	<i>L. gasseri/L. johnsonii</i>	99 %
	2	<i>L. casei/L. paracasei</i>	99 %
P34V2	3	<i>L. gasseri/L. johnsonii</i>	99 %
P34R2	4	<i>L. gasseri/ L. johnsonii</i>	99%
P35M2	5	<i>L. rhamnosus</i>	100%
P35V2	6	<i>L. iners</i>	98 %
P36R2	7	<i>L. iners</i>	98 %

Tab. 4-10: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 2 und Marker

Probe	Bande	Ergebnis
P34V2	A	<i>L. gasseri/L. johnsonii</i>
P36V2	B	<i>L. crispatus</i>

P35R2 und P36M2 lieferten keine brauchbaren Ergebnisse.

Die zweite starke Bande bei der Probe P35V2 wurde nicht markiert, da es sich hier höchstwahrscheinlich ebenfalls um eine Bande der Lactobacillenart *L. iners* handelt.

Gel 3:

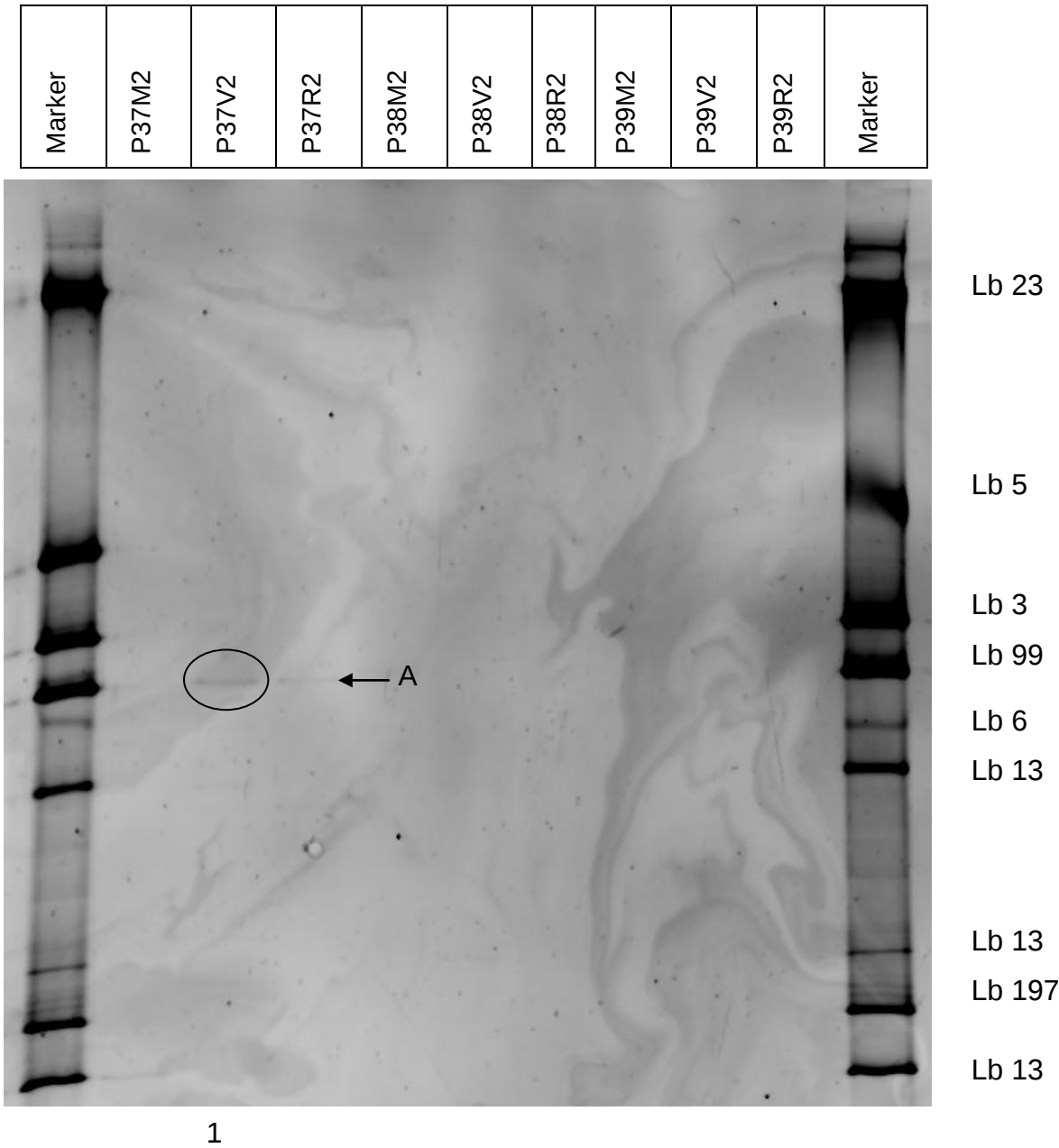


Abb. 4-53: DGGE-Gel 3 der Proben P37M2, P37V2, P37R2, P38M2, P38V2, P38R2, P39M2, P39V2 und P39R2.

Tab. 4-11: Sequenzierungsergebnisse von Gel 3

Probe	Nr.	Ergebnis	% Identity
P37V2	1	<i>L. jensenii</i>	98 %

Tab. 4-12: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 3 und Marker

Probe	Bande	Ergebnis
P37R2	A	<i>L. jensenii</i>

Auch eine Wiederholung lieferte keine besseren Ergebnisse. Bei P37M2, P38M2, P38V2, P38R2, P39M2, P39V2 und P39R2 konnten keine Lactobacillen nachgewiesen werden.

Gel 4:

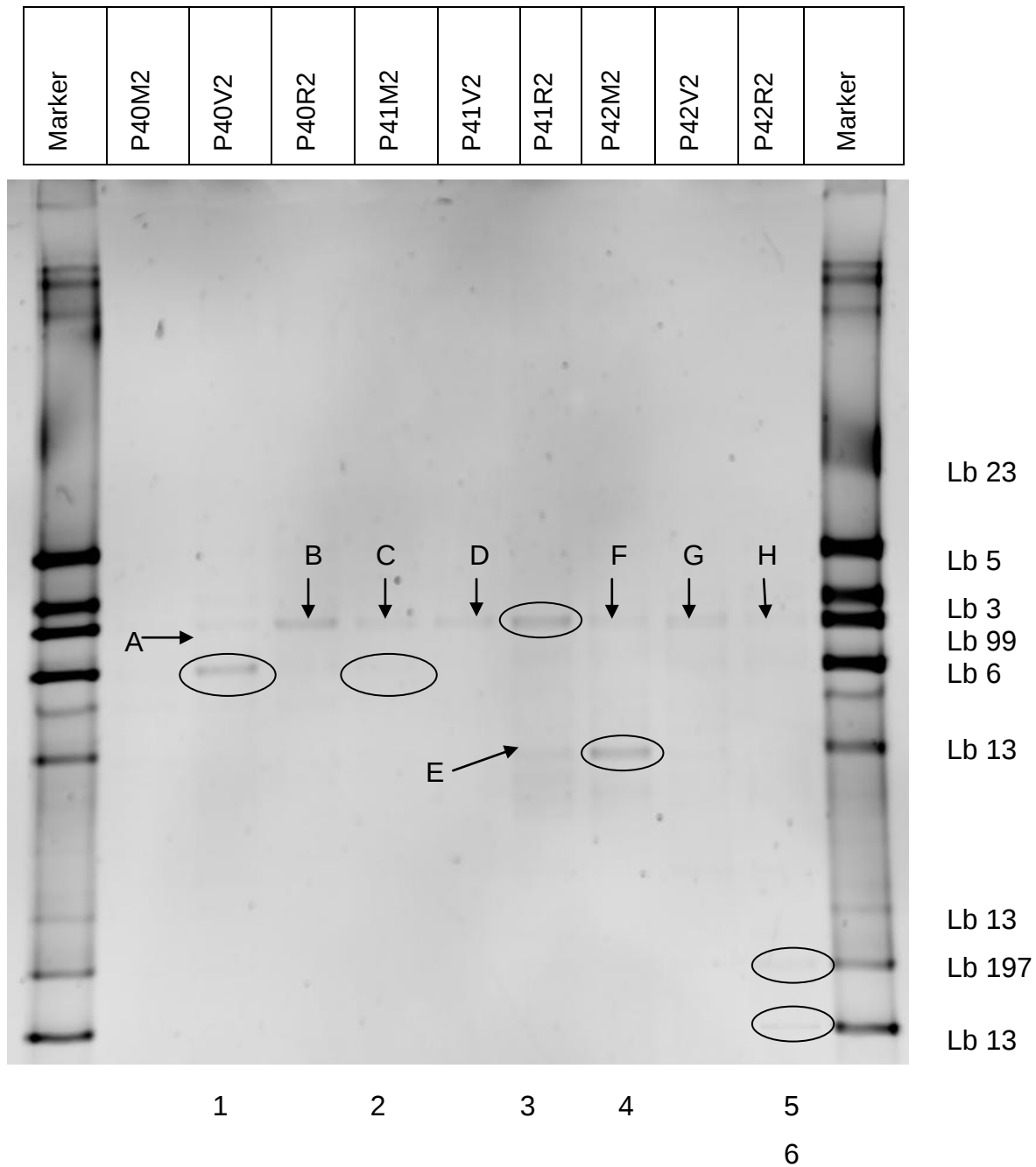


Abb. 4-54: DGGE-Gel 4 der Proben P40M2, P40V2, P40R2, P41M2, P41V2, P41R2, P42M2, P42V2 und P42R2.

Tab. 4-13: Sequenzierungsergebnisse von Gel 4

Probe	Nr.	Ergebnis	% Identity
P40V2	1	<i>L. helveticus</i>	98 %
P41M2	2	<i>L. helveticus</i>	99%
P41R2	3	<i>L. jensenii</i>	98 %
P42M2	4	<i>L. iners</i>	98%
P42R2	5	<i>L. rhamnosus</i>	99 %
	6	<i>L. reuteri</i>	99 %

Tab. 4-14: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 4 und Marker

Probe	Bande	Ergebnis
P40V2	A	<i>L. jensenii</i>
P40R2	B	<i>L. jensenii</i>
P41M2	C	<i>L. jensenii</i>
P41V2	D	<i>L. jensenii</i>
P41R2	E	<i>L. iners</i>
P42M2	F	<i>L. jensenii</i>
P42V2	G	<i>L. jensenii</i>
P42R2	H	<i>L. jensenii</i>

Bei diesen Proben konnten bei Probandin Nr. 40 in dem oralen Abstrich keine Lactobacillen nachgewiesen werden.

Gel 5:

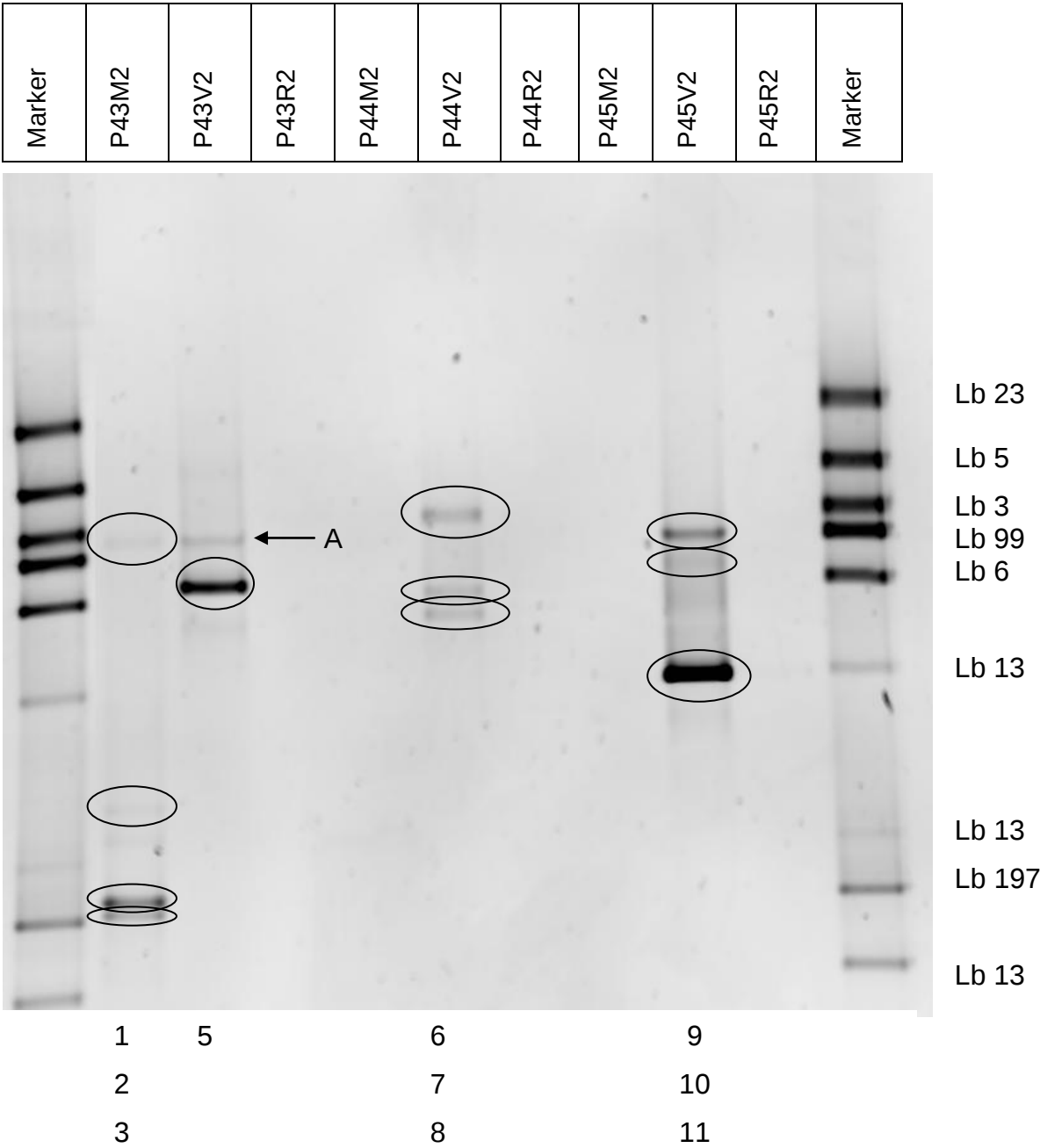


Abb. 4-55: DGGE-Gel 5 der Proben P43M2, P43V2, P43R2, P44M2, P44V2, P44R2, P45M2, P45V2 und P45R2.

Tab. 4-15: Sequenzierungsergebnisse von Gel 5

Probe	Nr.	Ergebnis	% Identity
P43M2	1	<i>L. casei/ L. paracasei</i> <i>L. helveticus</i>	98 %
	2	<i>L. casei/ L. paracasei</i> <i>L. helveticus</i>	98 %
	3	<i>L. casei/ L. paracasei</i> <i>L. helveticus</i>	98 %
	4	<i>L. rhamnosus</i>	99 %
P43V2	5	<i>L. crispatus</i>	99 %
P44V2	6	<i>L. gasseri</i>	99 %
	7	<i>L. delbrueckii</i>	99 %
	8	<i>L. delbrueckii</i>	100 %
P45V2	9	<i>L. iners</i>	98 %
	10	<i>L. iners</i>	99 %
	11	<i>L. iners</i>	99 %

Tab. 4-16: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 5 und Marker

Probe	Bande	Ergebnis
P43V2	A	<i>L. casei/ L. paracasei</i> <i>L. helveticus</i>

P43R2, P44M2, P44R2, P45M2, sowie P45R2 zeigten keine Ergebnisse.

Gel 6:

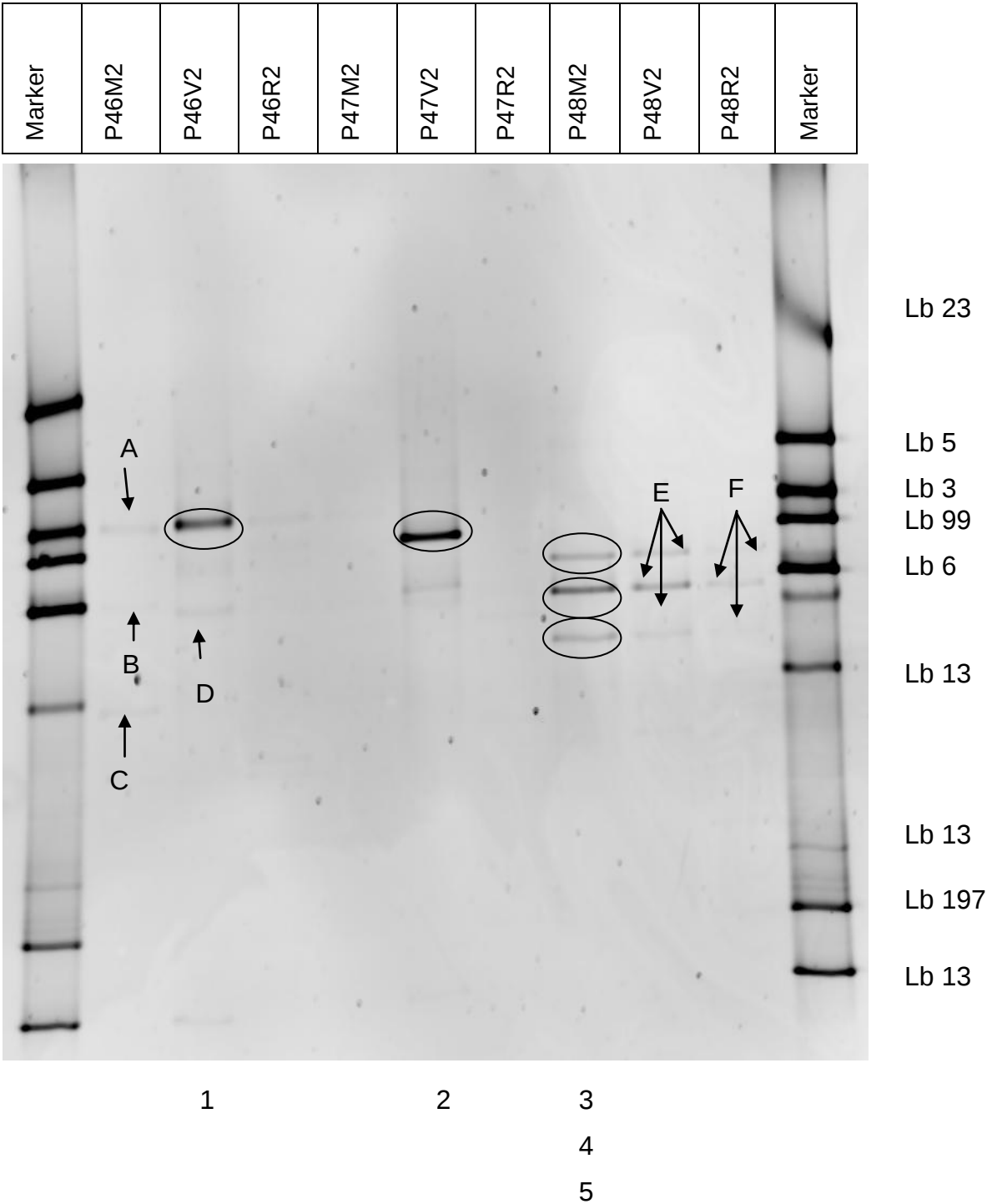


Abb. 4-56: DGGE-Gel 6 der Proben P46M2, P46V2, P46R2, P47M2, P47V2, P47R2, P48M2, P48V2 und P48R2.

Tab. 4-17: Sequenzierungsergebnisse von Gel 6

Probe	Nr.	Ergebnis	% Identity
P46V2	1	<i>L. gasseri</i>	98 %
P47V2	2	<i>L. jensenii</i>	98 %
P48M2	3	<i>L. salivarius</i>	99 %
	4	<i>L. salivarius</i>	99 %
	5	<i>L. salivarius</i>	99 %

Tab. 4-18: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 6 und Marker

Probe	Bande	Ergebnis
P46M2	A	<i>L. gasseri</i>
	B	<i>L. crispatus</i>
	C	<i>L. reuteri</i>
P46V2	D	<i>L. crispatus</i>
P48V2	E	<i>L. salivarius</i>
P48R2	F	<i>L. salivarius</i>

P46R2, P47M2 und P47R2 zeigten keine verwertbaren Ergebnisse.

Gel 7:

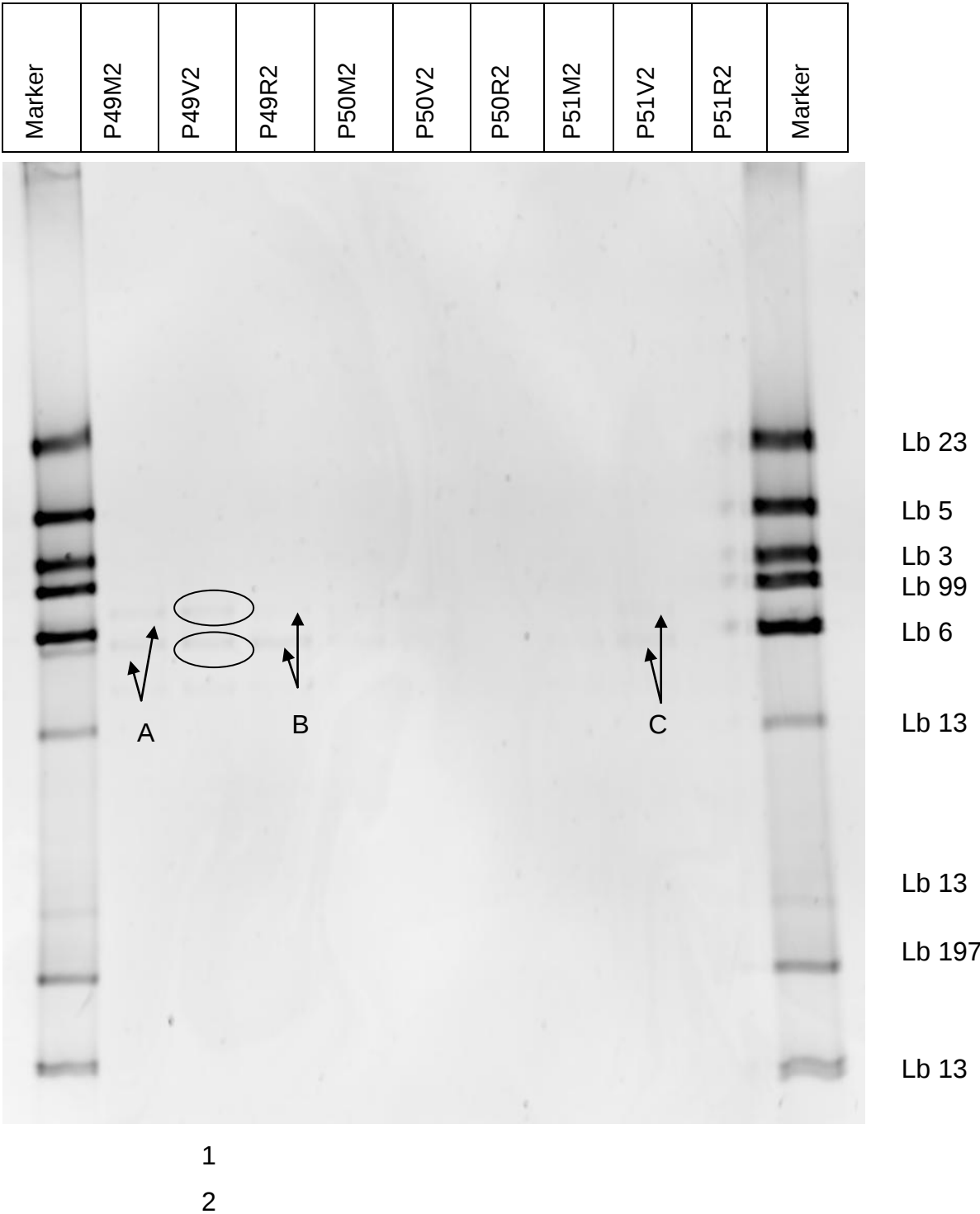


Abb. 4-57: DGGE-Gel 7 der Proben P49M2, P49V2, P49R2, P50M2, P50V2, P50R2, P51M2, P51V2 und P51R2.

Tab. 4-19: Sequenzierungsergebnisse von Gel 7

Probe	Nr.	Ergebnis	% Identity
P49V2	1	<i>L. salivarius</i>	99 %
	2	<i>L. salivarius</i>	99 %

Tab. 4-20: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 7 und Marker

Probe	Bande	Ergebnis
P49M2	A	<i>L. salivarius</i>
P49R2	B	<i>L. salivarius</i>
P51V2	C	<i>L. salivarius</i>

Die Isolate der Proben P50M2, P50V2, P50R2, P51M2 und P51R2 lieferten keine Ergebnisse.

Gel 8:

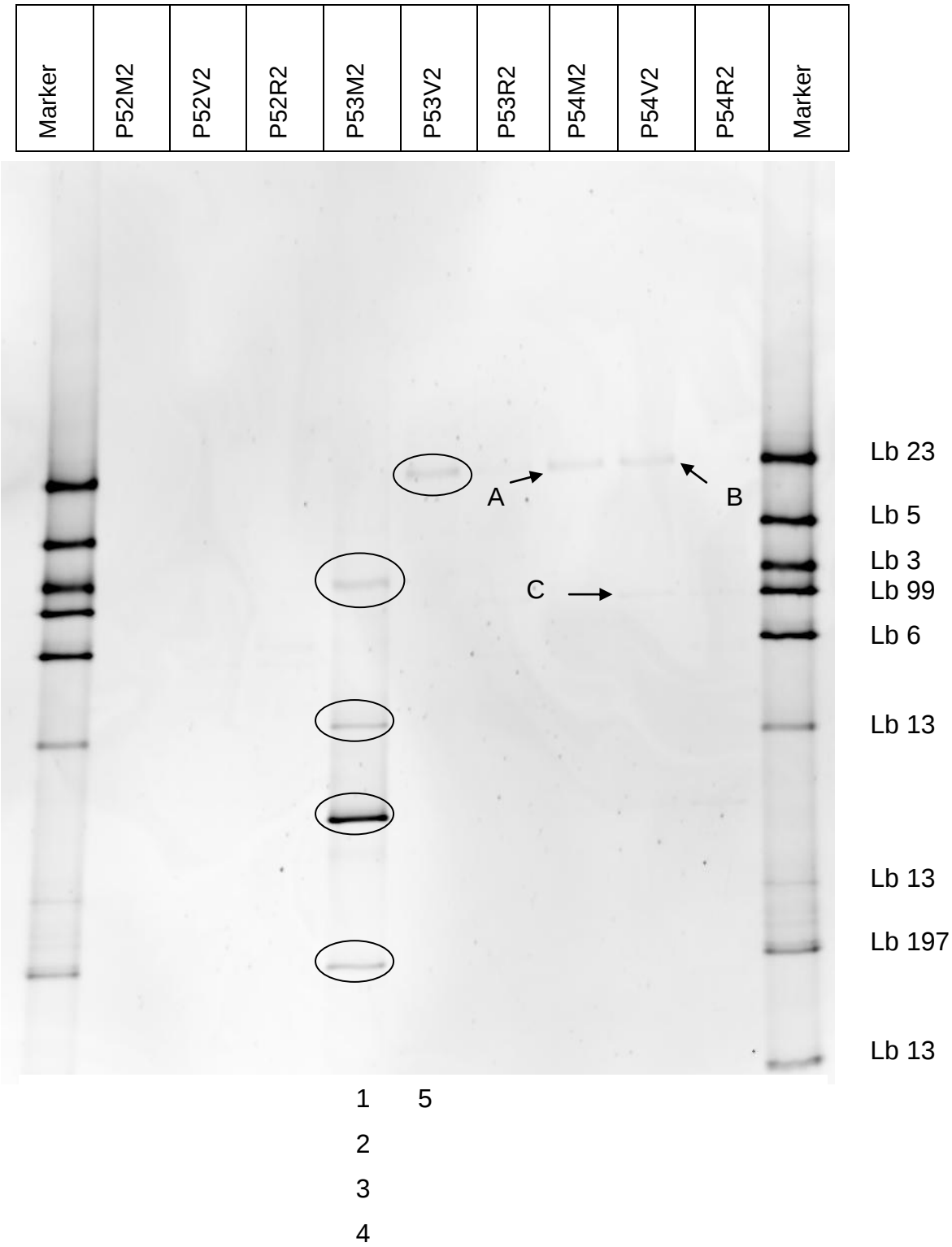


Abb. 4-58: DGGE-Gel 8 der Proben P52M2, P52V2, P52R2, P53M2, P53V2, P53R2, P54M2, P54V2 und P54R2.

Tab. 4-21: Sequenzierungsergebnisse von Gel 8

Probe	Nr.	Ergebnis	% Identity
P53M2	1	<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>	99 %
	2	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	97 %
	3	<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>	99 %
	4	<i>L. casei/L. paracasei</i>	99 %
P53V2	5	<i>L. plantarum</i>	100 %

Da es sich bei den ersten drei Sequenzierungsergebnissen nicht um Lactobacillen handelt, wurden diese grau hinterlegt.

Tab. 4-22: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 8 und Marker

Probe	Bande	Ergebnis
P54M2	A	<i>L. plantarum</i>
P54V2	B	<i>L. plantarum</i>
	C	<i>L. jensenii</i>

Bei den Proben P52M2, P52V2, P52R2, P53R2 und P54R2 konnten keine verwertbaren Ergebnisse nachgewiesen werden.

Gel 9:

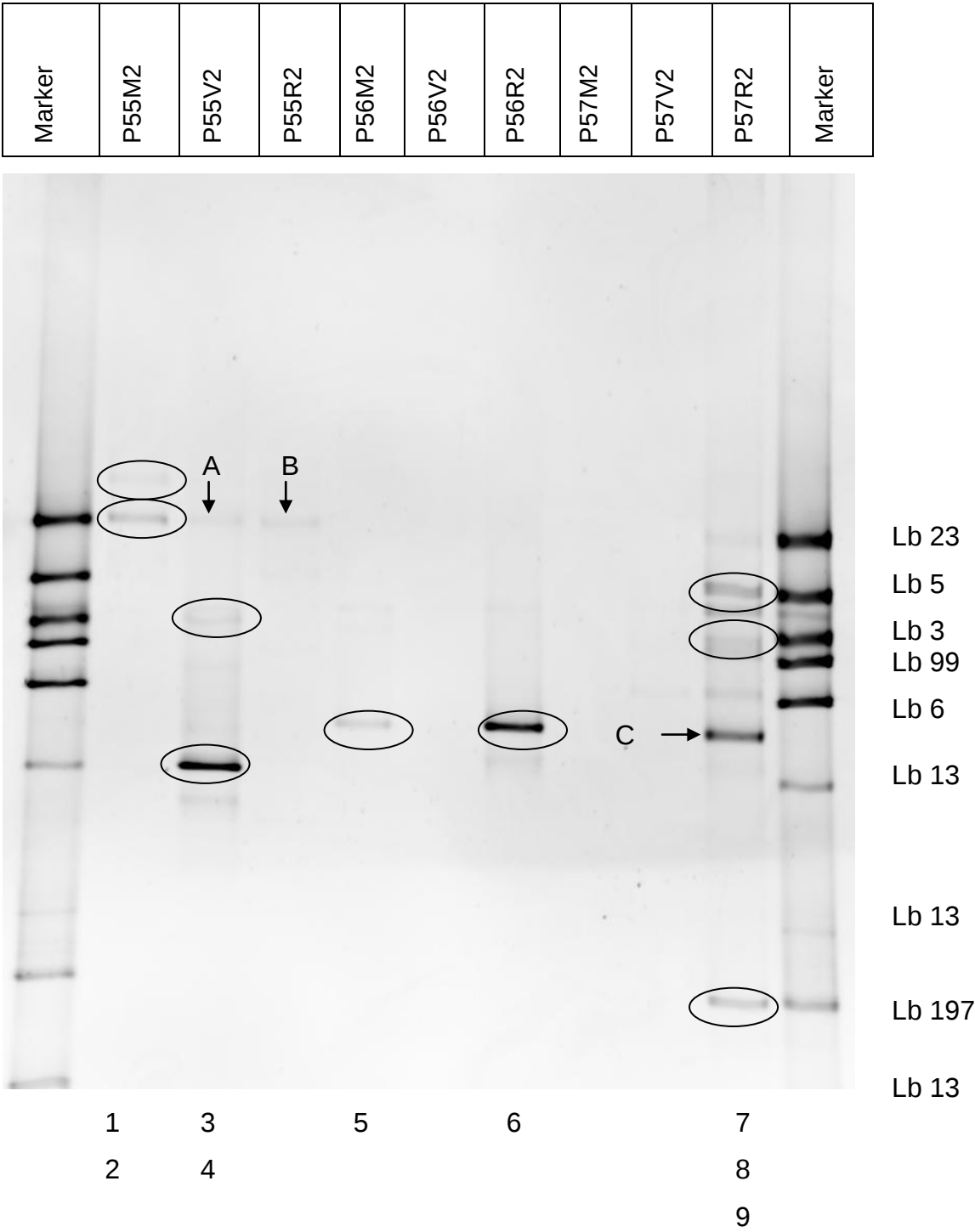


Abb. 4-59: DGGE-Gel 9 der Proben P55M2, P55V2, P55R2, P56M2, P56V2, P56R2, P57M2, P57V2 und P57R2.

Tab. 4-23: Sequenzierungsergebnisse von Gel 9

Probe	Nr.	Ergebnis	% Identity
P55M2	1	<i>L. plantarum</i>	98 %
	2	<i>L. plantarum</i>	99 %
P55V2	3	<i>L. gasseri</i>	98 %
	4	<i>L. iners</i>	98 %
P56M2	5	<i>L. sakei</i>	99 %
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99 %
P56R2	6	<i>Leuconostoc lactis</i>	99 %
P57R2	7	<i>L. sakei</i>	99 %
	8	<i>Carnobacterium divergens</i>	97 %
	9	<i>L. casei/L. paracasei</i>	98 %

Tab. 4-24: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 9 und Marker

Probe	Bande	Ergebnis
P55V2	A	<i>L. plantarum</i>
P55R2	B	<i>L. plantarum</i>
P57R2	C	<i>Leuconostoc lactis</i>

Bei P56V2, P57M2 und P57V2 konnte nichts nachgewiesen werden.

Gel 10:

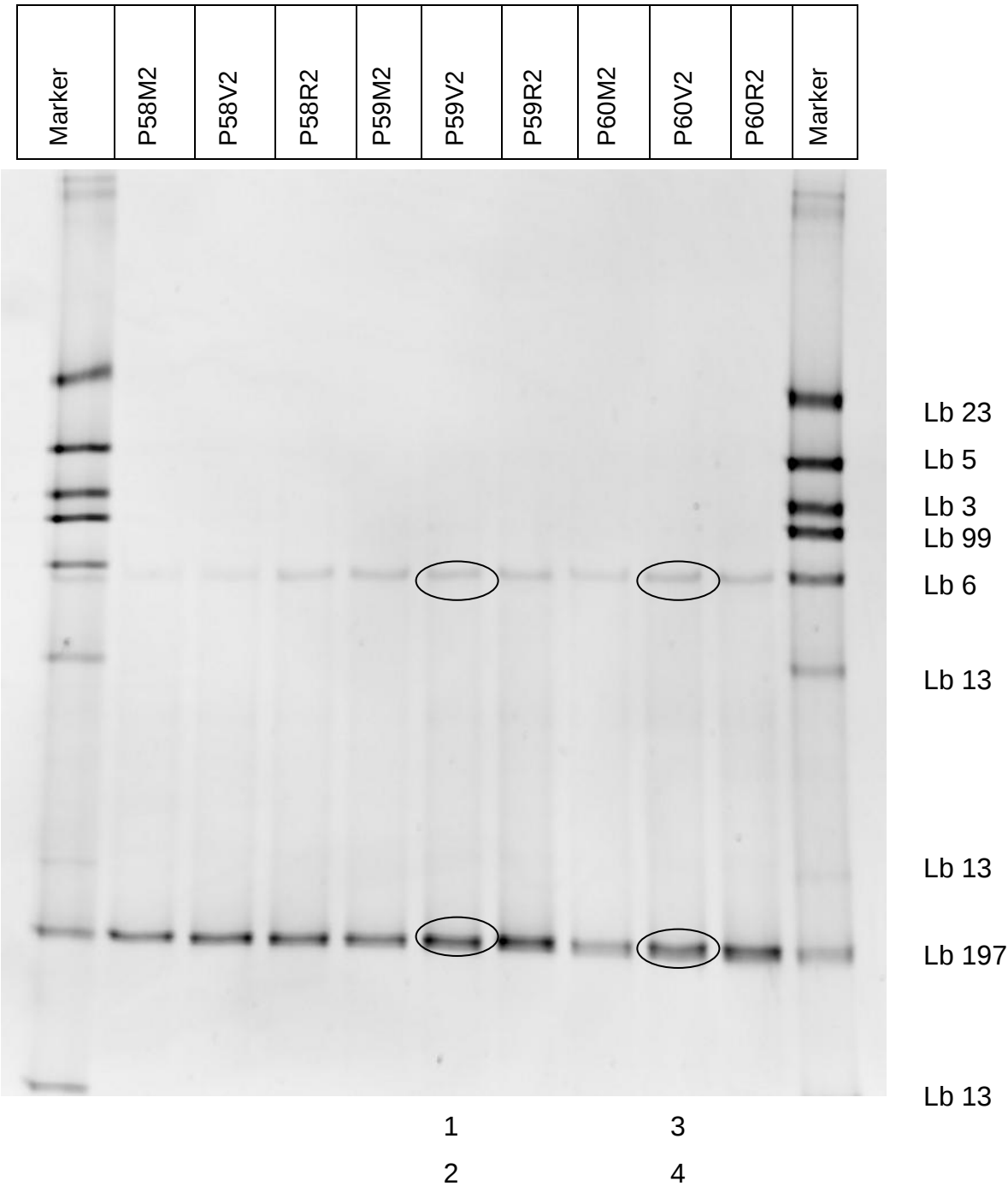


Abb. 4-60: DGGE-Gel 10 der Proben P58M2, P58V2, P58R2, P59M2, P59V2, P59R2, P60M2, P60V2 und P60R2.

Tab. 4-25: Sequenzierungsergebnisse von Gel 10

Probe	Nr.	Ergebnis	% Identity
P59V2	1	<i>L. casei/L. paracasei</i>	99 %
	2	<i>L. casei/L. paracasei</i>	99 %
P60V2	3	<i>L. casei/L. paracasei</i>	98 %
	4	<i>L. casei/L. paracasei</i>	99 %

Da es sich bei den Banden, die nicht sequenziert wurden augenscheinlich um die gleichen handelt, wurden sie in der Abbildung und in der folgenden Tabelle nicht extra mit Großbuchstaben markiert.

Tab. 4-26: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 10 und Marker

Probe	Ergebnis
P58M2	<i>L. casei / L. paracasei</i>
P58V2	<i>L. casei / L. paracasei</i>
P58R2	<i>L. casei / L. paracasei</i>
P59M2	<i>L. casei / L. paracasei</i>
P59V2	<i>L. casei / L. paracasei</i>
P59R2	<i>L. casei / L. paracasei</i>
P60M2	<i>L. casei / L. paracasei</i>
P60V2	<i>L. casei / L. paracasei</i>
P60R2	<i>L. casei / L. paracasei</i>

Die Ergebnisse werden sowohl in der folgenden Tabelle als auch der Übersicht halber in Abbildungen grafisch dargestellt.

Tab. 4-27: Diversitätsanalyse durch PCR-DGGE

	Oral	Rektal	Vaginal	Gesamt
<i>L. jensenii</i>	2	4	7	13
<i>L. casei / paracasei</i>	7	4	4	15
<i>L. iners</i>	1	2	4	7
<i>L. crispatus</i>	1	0	4	5
<i>L. gasseri</i>	1	0	3	4
<i>L. salivarius</i>	3	2	3	8
<i>L. plantarum</i>	2	1	3	6
<i>L. helveticus</i>	2	0	3	5
<i>L. johnsonii / L. gasseri</i>	3	3	1	7
<i>L. reuteri</i>	3	1	1	5
<i>L. delbrueckii</i>	0	0	1	1
<i>L. rhamnosus</i>	2	1	0	3
<i>L. sakei</i>	1	1	0	2
<i>L. fermentum</i>	1	0	0	1

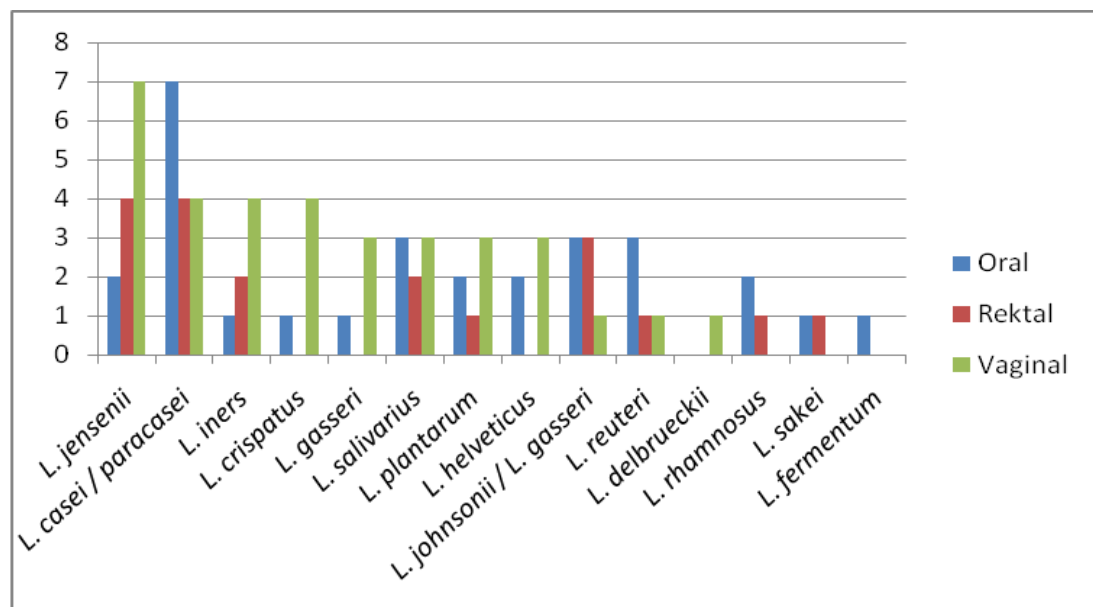


Abb. 4-61: Verteilung der mittels DGGE identifizierten Arten.

L. jensenii ist am häufigsten vertreten, gefolgt von der *L. casei/paracasei* Gruppe, *L. iners* und *L. crispatus*. Weiters konnten *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L.johnsonii/L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus*, *L. sakei* und *L. fermentum* nachgewiesen werden.

Orale Abstriche:

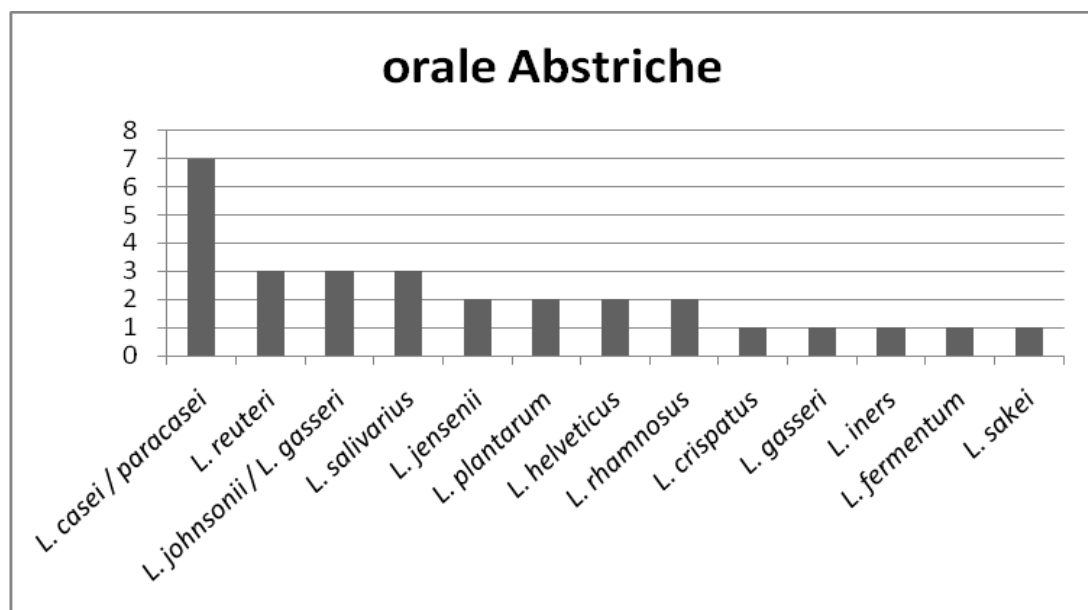


Abb. 4-62: Verteilung der mittels DGGE identifizierten oralen Arten.

Bei den oralen Abstrichen dominiert die *L. casei/L. paracasei* Gruppe, gefolgt von *L. reuteri*, *L. johnsonii/L. gasseri* und *L. salivarius*. Weitere Arten waren *L. jensenii*, *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. fermentum* und *L.sakei*.

Rektale Abstriche:

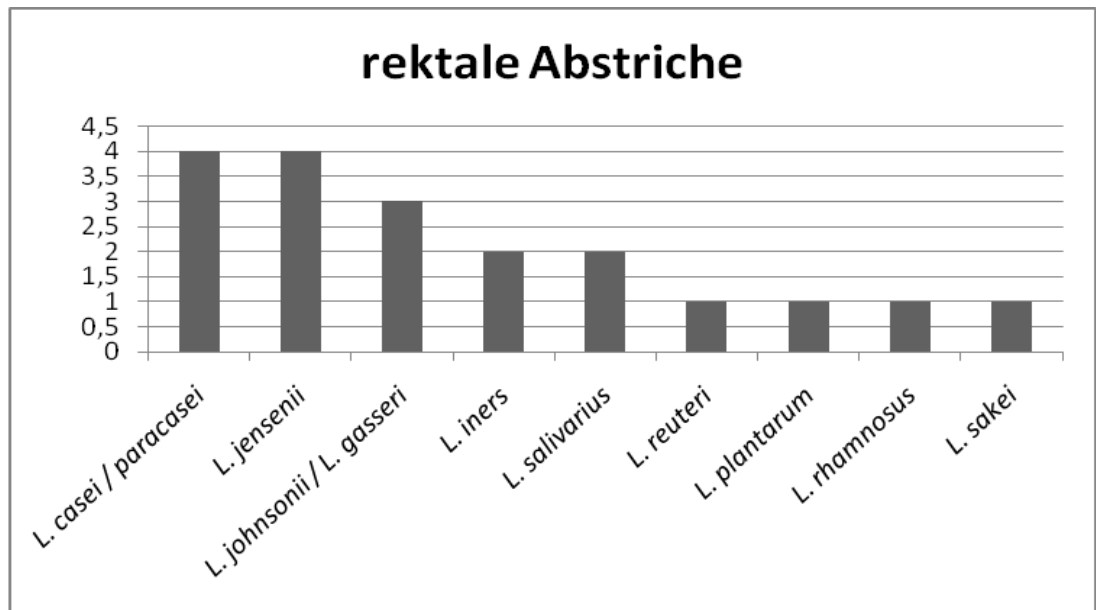


Abb. 4-63: Verteilung der mittels DGGE identifizierten rektalen Arten.

Am häufigsten vertreten sind hier die *L. casei/L. paracasei* Gruppe und *L. jensenii*, gefolgt von *L. johnsonii/L. gasseri*, *L. iners*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* und *L. sakei*.

Vaginale Abstriche:

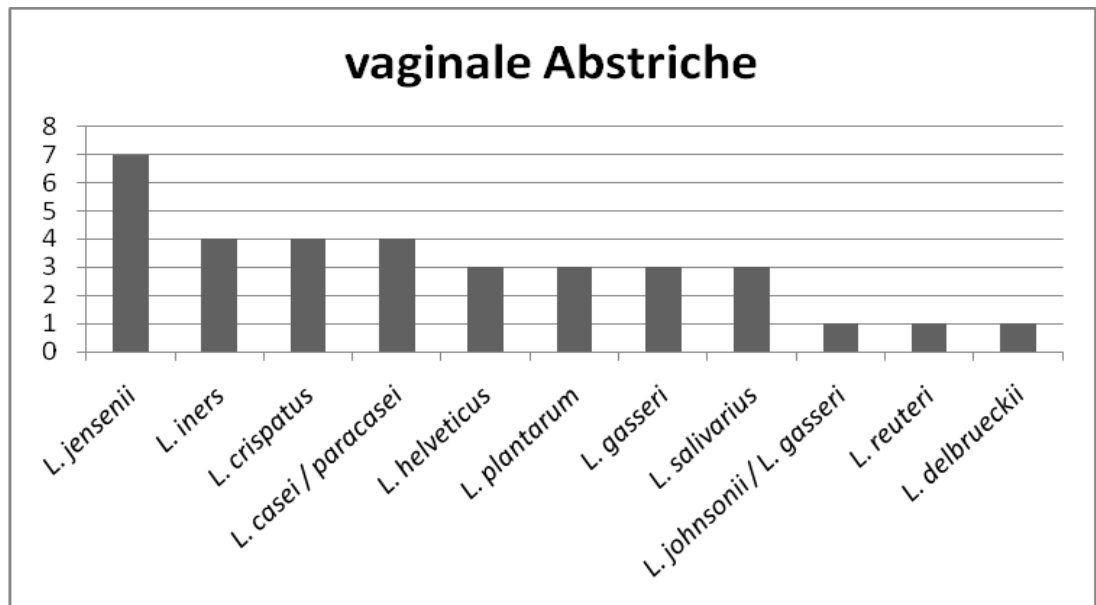


Abb. 4-64: Verteilung der mittels DGGE identifizierten vaginalen Arten.

Hier steht *L. jensenii* an erster Stelle, gefolgt von *L. iners*, *L. crispatus* und der *L. casei/L. paracasei* Gruppe. Weitere Arten sind *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. johnsonii/L. gasseri*, *L. reuteri* und *L. delbrueckii*.

Eine Tabelle mit den zusammengefassten gesamten Ergebnissen – Abstrich 1 und 2 – befindet sich im Anhang.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war neben der Identifizierung der Lactobacillen in ihren verschiedenen humanen Lebensräumen auch der Vergleich zwischen schwangeren und postmenopausalen Frauen. Gerade im vaginalen Bereich sind Lactobacillen von großer Bedeutung. Mit zunehmendem Alter reduziert sich der Anteil an Lactobacillen, aufgrund des sinkenden Östrogenspiegels. Bakterielle Vaginose oder Pilzinfektionen können die Folge sein [PETRICEVIC et al., 2008].

Um das zu verhindern ist es von großer Bedeutung Probiotika zu entwickeln, die den Lactobacillengehalt stabilisieren bzw. konstant halten.

5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse der schwangeren Probandinnen

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der kulturellen Isolate (Abstrich 1), sowie jene, der direkt molekularbiologisch untersuchten Proben (Abstrich 2) der schwangeren Versuchspersonen dargestellt.

Wie in Tabelle 5-1 und Abbildung 5-1 dargestellt, zeigt sich, dass bei den kulturellen Isolaten, also Abstrich 1, bei der Betrachtung der gesamten Abstrichsorte die Arten *L. crispatus*, *L. paracasei* und *L. johnsonii* dominieren. Betrachtet man hingegen nur die vaginale Mikrobiota, zeigt sich, dass sie von *L. crispatus* dominiert wird, gefolgt von *L. gasseri* und *L. johnsonii*.

Bei den direkt molekularbiologisch untersuchten Proben (Abstrich 2) dominiert gesamt *L. crispatus*, gefolgt von *L. iners* und *L. reuteri*. Wenn auch hier nur der vaginalen Abstrich betrachtet wird, so zeigt sich, dass hier *L. iners* und *L. crispatus* vorherrschen (siehe Tabelle 5-2 und Abbildung 5-2).

Tab. 5-1: Verteilung der kulturellen Isolate auf Abstrichsorte und *Lactobacillus*-Arten.
[KRONDORFER, 2008]

	Oral	Rektal	Vaginal	Gesamt
<i>L. crispatus</i>	2	7	16	25
<i>L. gasseri</i>	4	5	8	17
<i>L. johnsonii</i>	7	7	6	20
<i>L. jensenii</i>	1	1	5	7
<i>L. paracasei</i>	8	11	3	22
<i>L. rhamnosus</i>	2	4	3	9
<i>L. acidophilus</i>	0	1	2	3
<i>L. curvatus</i>	0	0	2	2
<i>L. fermentum</i>	3	2	0	5
<i>L. ruminis</i>	0	2	0	2
<i>L. oris</i>	1	0	0	1
<i>L. reuteri</i>	1	0	0	1
<i>L. salivarius</i>	0	1	0	1
Summe	29	41	45	115

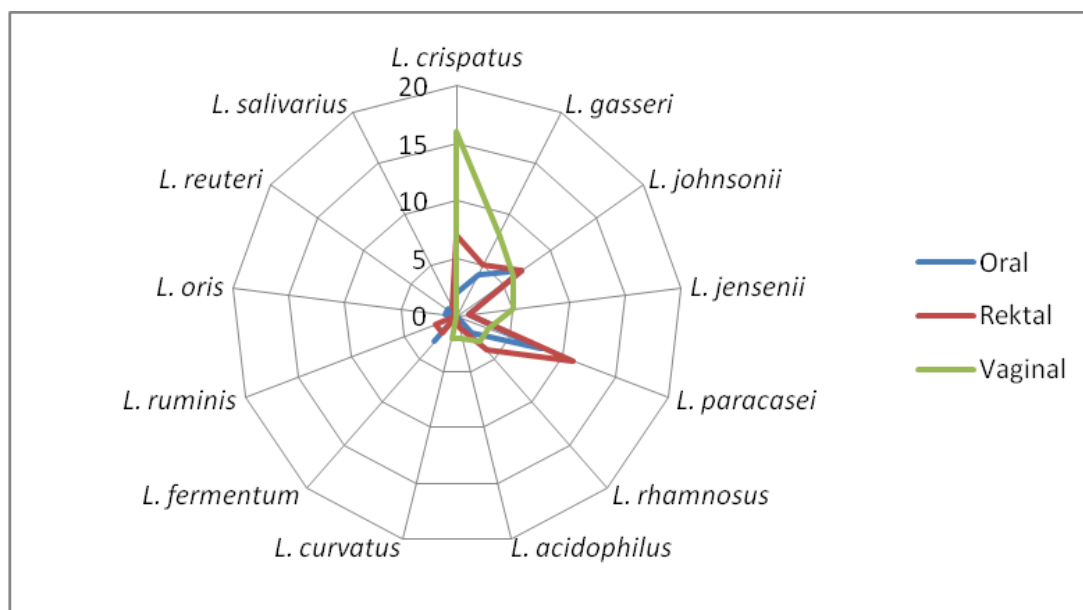


Abb. 5-1: Verteilung der mittels Kultivierung identifizierten Arten der schwangeren Probandinnen.

Tab. 5-2: Verteilung der durch PCR-DGGE erhaltenen Isolate auf Abstrichsorte und *Lactobacillus*-Arten und anderen identifizierten Arten. [KRONDORFER, 2008]

	Oral	Rektal	Vaginal	Gesamt
<i>L. iners</i>	0	14	16	30
<i>L. crispatus</i>	12	19	15	46
<i>L. johnsonii</i> / <i>L. gasseri</i>	5	8	3	16
<i>L. jensenii</i>	1	3	3	7
<i>L. reuteri</i>	13	12	2	27
<i>L. johnsonii</i>	2	2	1	5
<i>L. helveticus</i>	0	0	1	1
<i>L. amylovorus</i>	0	0	1	1
<i>L. casei</i> -Gruppe	5	6	0	11
<i>L. curvatus</i>	6	1	0	7
<i>L. plantarum</i>	1	2	0	3
<i>L. gasseri</i>	1	0	0	1
<i>L. oris</i>	1	0	0	1
<i>Granulicatella</i> sp.	6	0	0	6
<i>Abiotrophia defectiva</i>	1	0	0	1
Summe	54	67	42	163

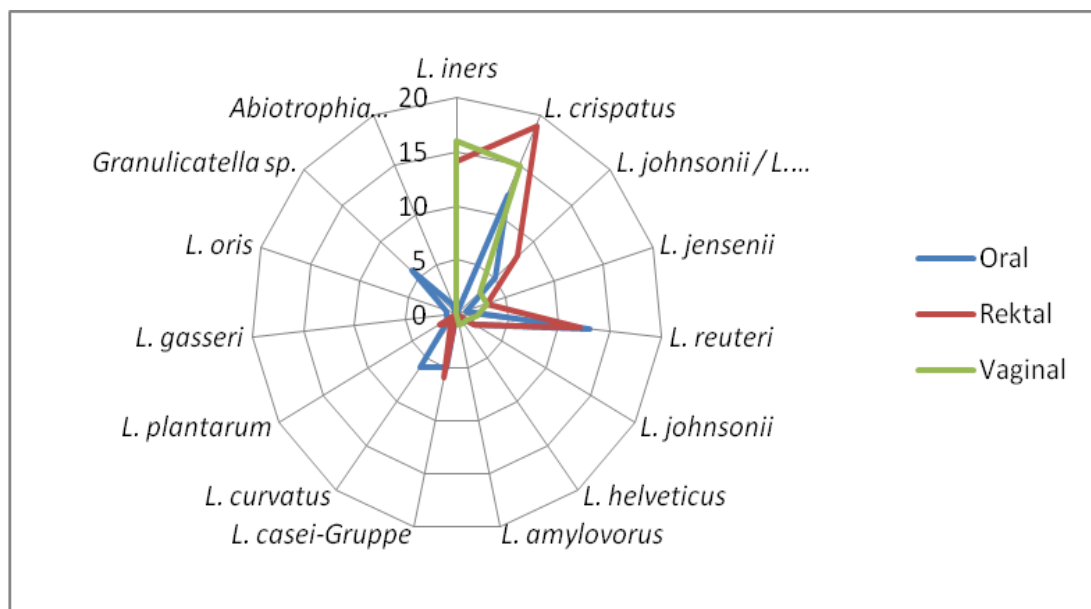


Abb. 5-2: Verteilung der mittels PCR-DGGE identifizierten Arten der schwangeren Probandinnen.

Es zeigt sich hier deutlich, dass im Vergleich zu den postmenopausalen Frauen die Anzahl der Arten der vorkommenden Lactobacillen größer ist. Auffällig ist, dass auch völlig unterschiedliche Arten vorkommen. So nimmt beispielsweise *L. johnsonii* bei den schwangeren Probandinnen eine vorherrschende Stellung ein und konnte bei den postmenopausalen Frauen gar nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5-2 und Tabelle 5-5).

Von den vaginalen Abstrichen wurden in absteigender Häufigkeit *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. jensenii*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. acidophilus* und *L. curvatus* isoliert. [KRONDORFER, 2008]

Die Gegenwart unterschiedlicher Lactobacillus Arten in der normalen Vaginal-Mikrobiota ist eine sehr große Determinante für die Stabilität dieser Mikrobiota während der Schwangerschaft. Besonders *L. crispatus* begünstigt die Stabilität der normalen vaginalen Mikroflora. Ebenso die Anwesenheit von *L. jensenii* wird mit einer normalen Vaginalflora assoziiert. Allerdings neigt *L. jensenii* dazu sich neben anderen Bakterien wettbewerbsschwach durchzusetzen. Das kann in weiterer Folge zu einem stärkeren Wachstum anderer Bakterien führen. Das Vorkommen von *L. gasseri* und/ oder *L. iners* dagegen variiert ständig. Diese Tatsache kann unter anderem zu einem Überwachstum an unerwünschten Bakterien in der Vagina während der Schwangerschaft führen. [VERSTRAELEN, 2009]

Die nachfolgende Tabelle 5-3 gibt Aufschluss darüber, welche Lactobacillen Arten als H₂O₂ Produzenten für die vaginale Gesundheit von großer Bedeutung sind und welche nur einen geringen bis keinen Einfluss haben [ESCHENBACH et al., 1989; OCANA et al., 1999; ROCHAT et al., 2006; SONG et al., 1999; STRUS et al., 2006].

.

Tab. 5-3: H₂O₂-Produktion von Lactobacillen. [ESCHENBACH et al., 1989; OCANA et al., 1999; ROCHAT et al., 2006; SONG et al., 1999; STRUS et al., 2006]

Positiv	Negativ	Stammspezifische Unterschiede
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. iners</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. paracasei</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. salivarius</i>
<i>L. gasseri</i>		<i>L. fermentum</i>
<i>L. jensenii</i>		<i>L. casei</i>
<i>L. vaginalis</i>		

In der Arbeit von Krondorfer konnte gezeigt werden, dass die vaginale Mikrobiota von Schwangeren hauptsächlich von H₂O₂ produzierenden Lactobacillen dominiert wird. Dies bestätigt die Annahme, dass eben diese Lactobacillen Arten äußerst wichtig für eine gesunde vaginale Mikrobiota sind.

5.2. Ergebnisse der postmenopausalen Frauen

5.2.1. Ergebnisse der Multiplex-PCR und Art-spezifischer Multiplex-PCR

In der nachfolgenden Tabelle 5-4 und in Abbildung 5-3 ist das Vorkommen der Lactobacillen bei den postmenopausalen Probandinnen an den unterschiedlichen Abstrichsorten dargestellt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Krondorfer, 2008 zeigt sich hier eine deutlich geringere Anzahl an Lactobacillen.

Tab. 5-4: Verteilung der kulturellen Isolate auf Abstrichsorte und *Lactobacillus*-Arten.

	Oral	Rektal	Vaginal	Gesamt
<i>L. paracasei</i>	6	9	6	21
<i>L. gasseri</i>	2	0	4	6
<i>L. crispatus</i>	0	0	2	2
<i>L. plantarum</i>	3	2	1	6
<i>L. fermentum</i>	0	1	1	2
<i>L. jensenii</i>	0	0	1	1
<i>L. delbrueckii</i>	1	2	0	3
<i>L. sakei</i>	1	0	0	1
<i>L. viridescens</i>	1	0	0	1
<i>L. oris</i>	0	1	0	1
<i>L. salivarius</i>	0	1	0	1
<i>L. casei</i>	0	1	0	1
Summe	14	17	15	46

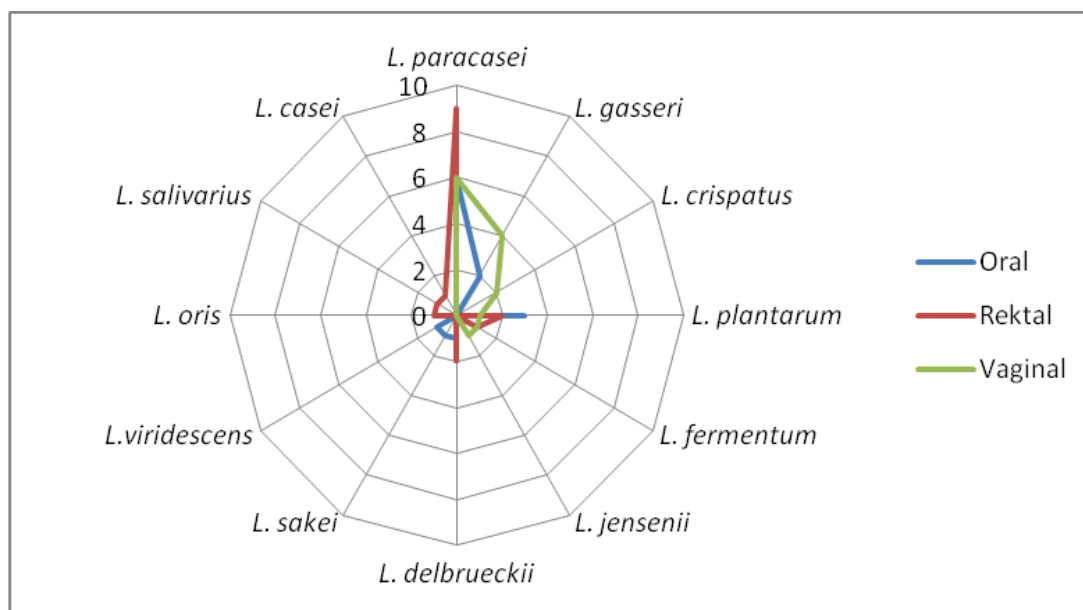


Abb. 5-3: Verteilung der kultivierten und identifizierten Arten der postmenopausalen Probandinnen

Die Kultivierung der Lactobacillen-Arten wurde auf MRS Agar vorgenommen. Da sich MRS-Agar für die Kultivierung aller Milchsäurebakterien eignet, ist er nicht selektiv für Lactobacillen [SCHILLINGER und HOLZAPFEL, 2003]. Das Wachstum aller Bakterien, die Milchsäure in nennenswerten Mengen bilden, wird durch MRS-Agar gefördert. Aus diesem Grund können auch die Gattungen *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* und *Leuconostoc* wachsen [OXOID, 2003].

Vor allem konnte in dieser Arbeit ein vermehrtes Wachstum von Enterococcen auf MRS-Agar nachgewiesen werden. Das erklärt auch die ermittelten Keimzahlen, in Relation zu der Ausbeute an Lactobacillen. Aus diesem Grund sollte man die Ergebnisse auch als Milchsäurebakterien-Keimzahlen betrachten und nicht als Lactobacillen-spezifisch.

Von den Platten, die im auszählbaren Bereich (30 – 300 KBE) lagen, wurden unterschiedliche Kolonieformen weiterüberimpft, um so Reinkulturen zu erhalten. Diese wurden dann in MRS-Bouillon weiterkultiviert, anschließend die Zellen geerntet und die DNA isoliert.

Mittels dieser kulturellen Methode konnten allerdings nicht alle Lactobacillusarten des Abstrichs nachgewiesen werden. So kann beispielsweise *L. iners* auf MRS-Agar gar nicht nachgewiesen werden, da er nur auf Blutagar wachsen kann [FALSEN et al., 1999].

Die isolierte DNA der Reinkulturen wurde in weiterer Folge mittels Gattungsspezifischer und Multiplex-PCR weiteruntersucht. Der Einsatz von *Lactobacillus*-spezifischen Primern sollte einer Vorausscheidung von *Lactobacillus*-negativen Isolaten dienen [KRONDORFER, 2008]. Wie sich schon in der Arbeit von Krondorfer, 2008 zeigte, eignete sich das Primerpaar Lac1-f/Lac2-r [WALTER et al., 2001] am besten zur Identifizierung der Lactobacillen.

Anschließend wurden die 66 *Lactobacillus*-positiven Isolate mittels Multiplex-PCR in Gruppen unterteilt. Folgende Primer wurden dabei verwendet: Ldel-7, LU-5', LU-3', LU-1' und Lac-2 [SONG et al., 2000]. Bei nicht eindeutigen bzw. nicht identifizierbaren Ergebnissen wurden die Proben sequenziert.

Dabei zeigte sich, dass es sich beim Großteil der nachgewiesenen Bakterien nicht um Lactobacillen handelte, sondern um Enterococcen, obwohl recht häufig, vor allem bei der Multiplex-PCR, ein für Lactobacillen positives

Ergebnis erhalten wurde. Das führt zu dem Schluss, dass die Primer dieser Multiplex-PCR nur begrenzt spezifisch sind.

Am häufigsten konnte *L. paracasei* nachgewiesen werden, gefolgt von *L. gasseri* und *L. plantarum*. *L. crispatus*, der bei den schwangeren Probandinnen an erster Stelle liegt, kommt bei den postmenopausalen Frauen erst an 4. Stelle (siehe Tabelle 5-4).

5.2.2. Ergebnisse von Abstrich 2 – PCR-DGGE

Tab. 5-5: Verteilung der durch PCR-DGGE erhaltenen Isolate auf Abstrichsorte und *Lactobacillus*-Arten.

	Oral	Rektal	Vaginal	Gesamt
<i>L. jensenii</i>	2	4	7	13
<i>L. casei / paracasei</i>	7	4	4	15
<i>L. iners</i>	1	2	4	7
<i>L. crispatus</i>	1	0	4	5
<i>L. gasseri</i>	1	0	3	4
<i>L. salivarius</i>	3	2	3	8
<i>L. plantarum</i>	2	1	3	6
<i>L. helveticus</i>	2	0	3	5
<i>L. johnsonii / L. gasseri</i>	3	3	1	7
<i>L. reuteri</i>	3	1	1	5
<i>L. delbrueckii</i>	0	0	1	1
<i>L. rhamnosus</i>	2	1	0	3
<i>L. sakei</i>	1	1	0	2
<i>L. fermentum</i>	1	0	0	1
<i>Leuconostoc sp.</i>	3	1	0	4
<i>Carnobacterium divergens</i>	0	1	0	1
Summe	32	21	34	87

Tabelle 5-5 gibt einen Überblick über die durch PCR-DGGE erhaltenen und identifizierten Isolate.

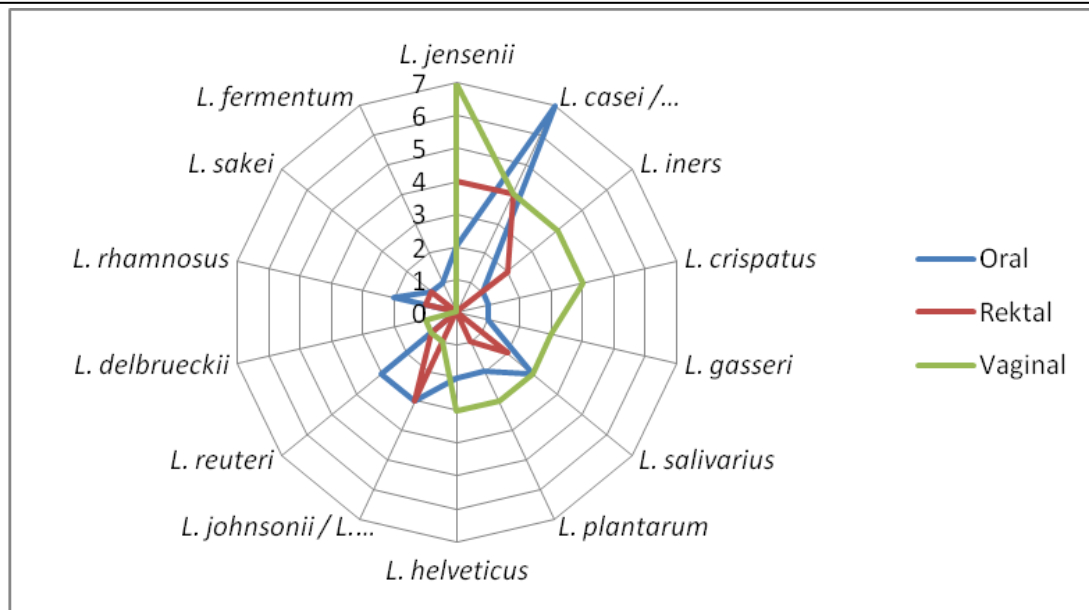


Abb. 5-4: Verteilung der mittels PCR-DGGE identifizierten Arten der postmenopausalen Probandinnen.

Die DNA wurde direkt isoliert und anschließend mit den gleichen Primern Lac1-f/Lac2-r [WALTER et al., 2001] wie bei der zuvor erwähnten kulturellen Methode (Abstrich 1) die PCR durchgeführt. Mit diesem PCR-Produkt wurde die DGGE durchgeführt. Der Vorteil dieser kultivierungsunabhängigen Methode beruht darauf, dass sowohl lebende als auch tote Mikroorganismen charakterisiert werden können. Doppelsträngige DNA-Fragmente werden aufgrund ihres unterschiedlichen Denaturierungs (Melting) Profiles aufgetrennt [LEE et. al, 2010; ERCOLINI, 2004]. DGGE bietet „fingerprints“ für jede mikrobielle Nische und wird weitgehend dafür genutzt die ökologische und menschliche Mikrobiota zu identifizieren [TIAN et al. 2010]. Die erhaltenen Ergebnisse wurden anschließend mittels Sequenzierung genau bestimmt.

Hier liegt die *L. casei/L. paracasei* Gruppe an erster Stelle, gefolgt von *L. jensenii* und *L. gasseri*. Das unterscheidet sich von den Ergebnissen der schwangeren Versuchspersonen. Dort konnte am häufigsten *L. crispatus*, vor *L. iners* und *L. reuteri* nachgewiesen werden.

5.3. Vergleich der Ergebnisse

In den folgenden Tabellen und Abbildungen zeigen sich nun die Ergebnisse der schwangeren im Vergleich zu denen der postmenopausalen Frauen.

Orale Abstriche:

Tabelle 5-6 zeigt die Ergebnisse der kultivierten und identifizierten oralen Isolate der schwangeren Probandinnen verglichen mit denen der postmenopausalen Probandinnen.

Tab. 5-6: Vergleich der kulturell erhaltenen oralen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen

	oral (schwanger)	oral (postmenopausal)
<i>L. paracasei</i>	5	5
<i>L. johnsonii</i>	6	0
<i>L. gasseri</i>	4	2
<i>L. fermentum</i>	3	0
<i>L. crispatus</i>	2	0
<i>L. rhamnosus</i>	2	0
<i>L. jensenii</i>	1	0
<i>L. reuteri</i>	1	0
<i>L. oris</i>	1	0
<i>L. plantarum</i>	0	2
<i>L. delbrueckii</i>	0	1
<i>L. viridescens</i>	0	1
<i>L. sakei</i>	0	1
Summe	25	12

Wie sich zeigt kommt nur *L. paracasei* bei beiden Gruppen gleich häufig vor. Ansonsten konnte bei keiner Lactobacillen-Art eine Übereinstimmung zwischen den schwangeren und den postmenopausalen Probandinnen in Bezug auf ihre Häufigkeit gefunden werden.

In den nachfolgenden Abbildungen 5-5- und 5-6 sind die Ergebnisse aus Tabelle 5-6 graphisch dargestellt.

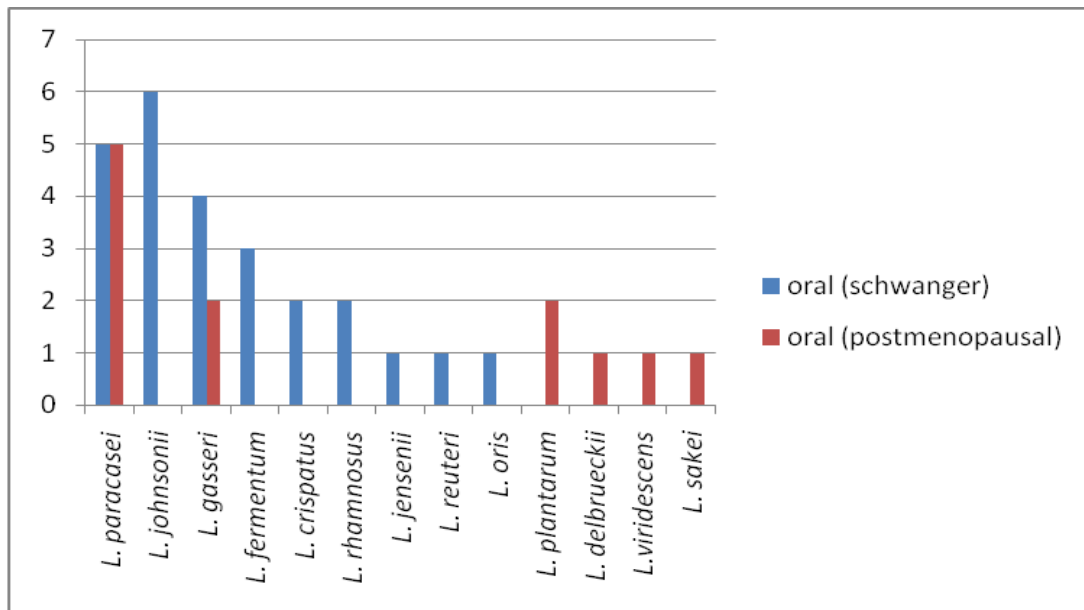


Abb. 5-5: Vergleich der kulturell erhaltenen oralen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen

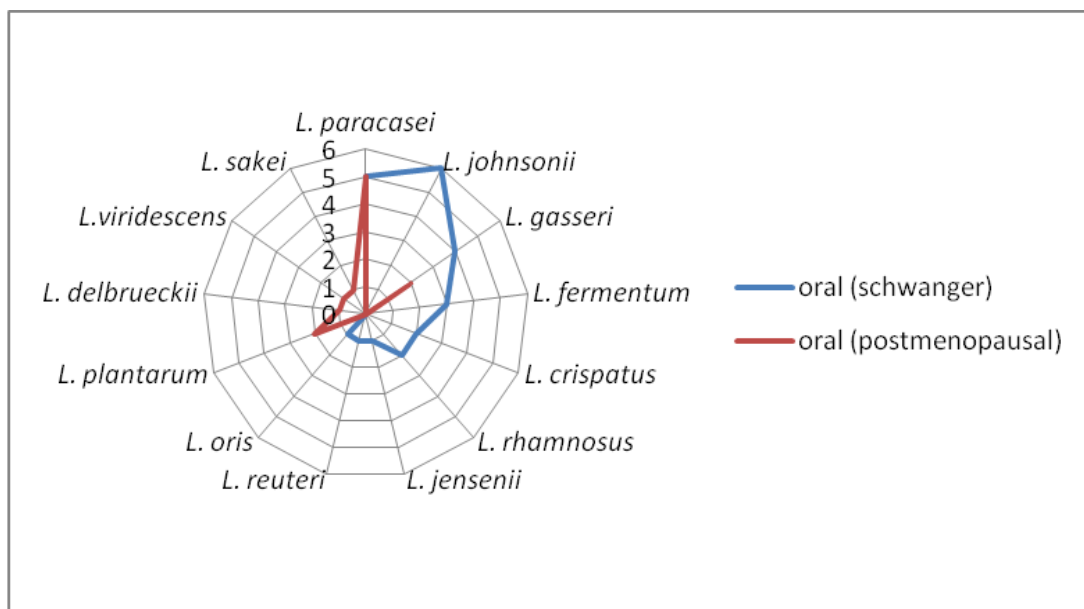


Abb. 5-6: Vergleich der kulturell erhaltenen oralen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen in anderer graphischer Darstellung

Auch bei der PCR-DGGE kam es zu einer unterschiedlichen Häufigkeitsverteilung, wie in Tabelle 5-7 dargestellt ist.

Tab. 5-7: Vergleich der oralen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen

	oral (schwanger)	oral (postmenopausal)
<i>L. reuteri</i>	13	3
<i>L. crispatus</i>	12	1
<i>L. casei</i> -Gruppe	5	7
<i>L. johnsonii</i> / <i>L. gasseri</i>	5	3
<i>L. curvatus</i>	6	0
<i>L. jensenii</i>	1	2
<i>L. plantarum</i>	1	2
<i>L. salivarius</i>	0	3
<i>L. johnsonii</i>	2	0
<i>L. helveticus</i>	0	2
<i>L. gasseri</i>	1	1
<i>L. rhamnosus</i>	0	2
<i>L. iners</i>	0	1
<i>L. fermentum</i>	0	1
<i>L. oris</i>	1	0
<i>L. sakei</i>	0	1
Summe	47	29

Die graphische Darstellung von Tabelle 5-7 findet sich in den Abbildungen 5-7 und 5-8.

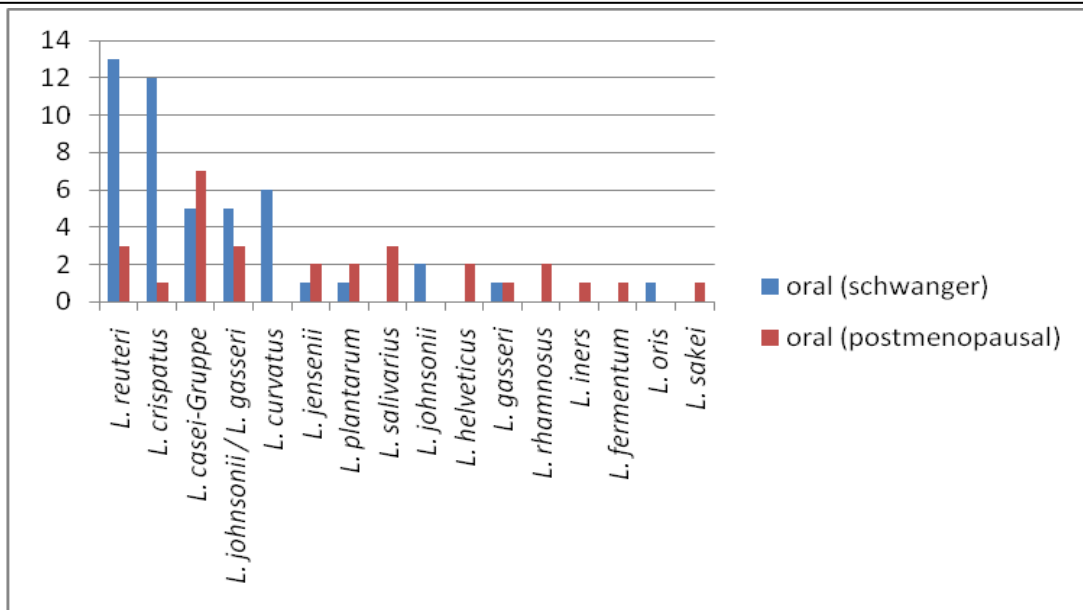


Abb. 5-7: Vergleich der oralen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen

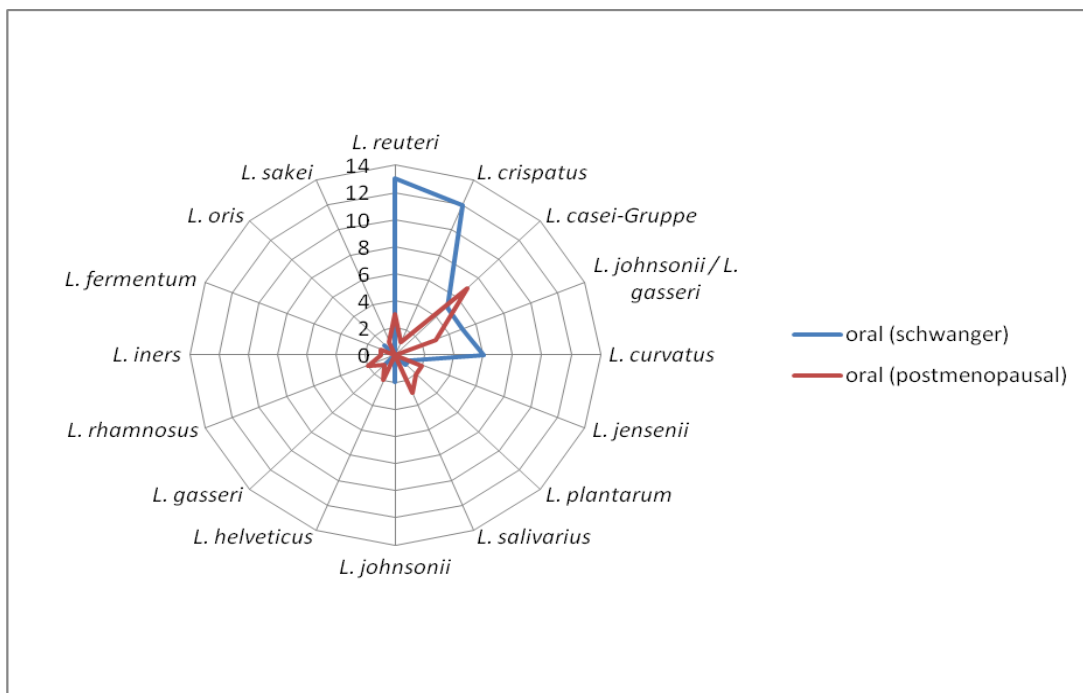


Abb. 5-8: Vergleich der oralen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen in anderer graphischer Darstellung

Rektale Abstriche:

Die folgenden Tabellen und Abbildungen (Tabelle 5-8, Abbildungen 5-9, 5-10) zeigen einen Vergleich der rektalen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Frauen.

Tab. 5-8: Vergleich der kulturell erhaltenen rektalen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen

	rektal (schwanger)	rektal (postmenopausal)
<i>L. paracasei</i>	8	8
<i>L. johnsonii</i>	7	0
<i>L. crispatus</i>	6	0
<i>L. gasseri</i>	5	0
<i>L. rhamnosus</i>	4	0
<i>L. fermentum</i>	2	1
<i>L. ruminis</i>	2	0
<i>L. salivarius</i>	1	1
<i>L. jensenii</i>	1	0
<i>L. acidophilus</i>	1	0
<i>L. oris</i>	0	1
<i>L. plantarum</i>	0	1
<i>L. delbrueckii</i>	0	1
<i>L. casei</i>	0	1
Summe	37	14

Abgesehen von *L. paracasei* konnte keine Übereinstimmung in der Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Arten nachgewiesen werden.

Die Abbildungen 5-9 und 5-10 zeigen die dazugehörige graphische Darstellung.

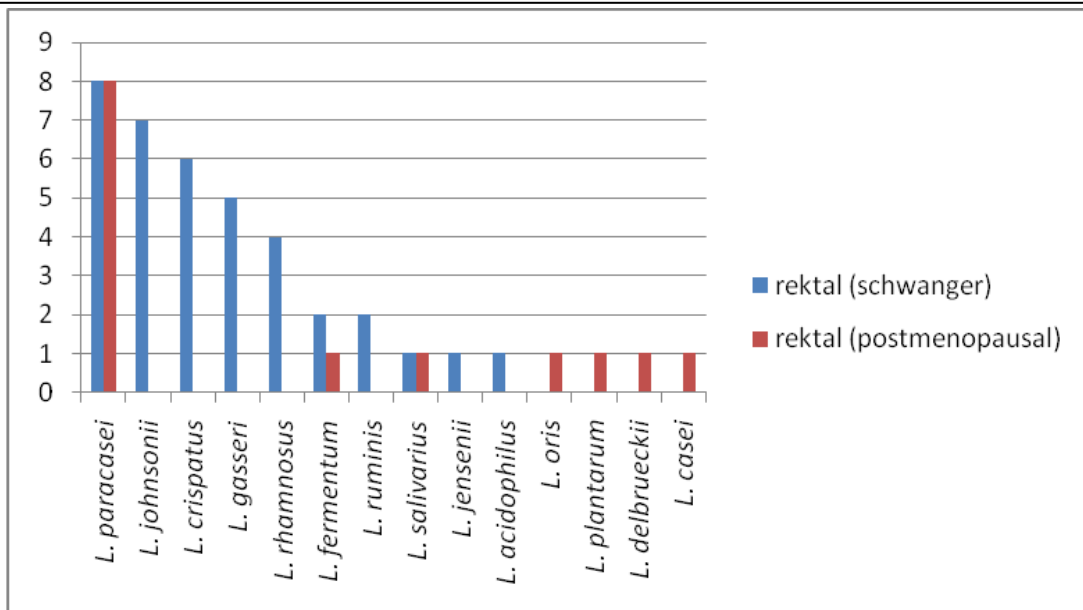


Abb. 5-9: Vergleich der kulturell erhaltenen rektalen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen

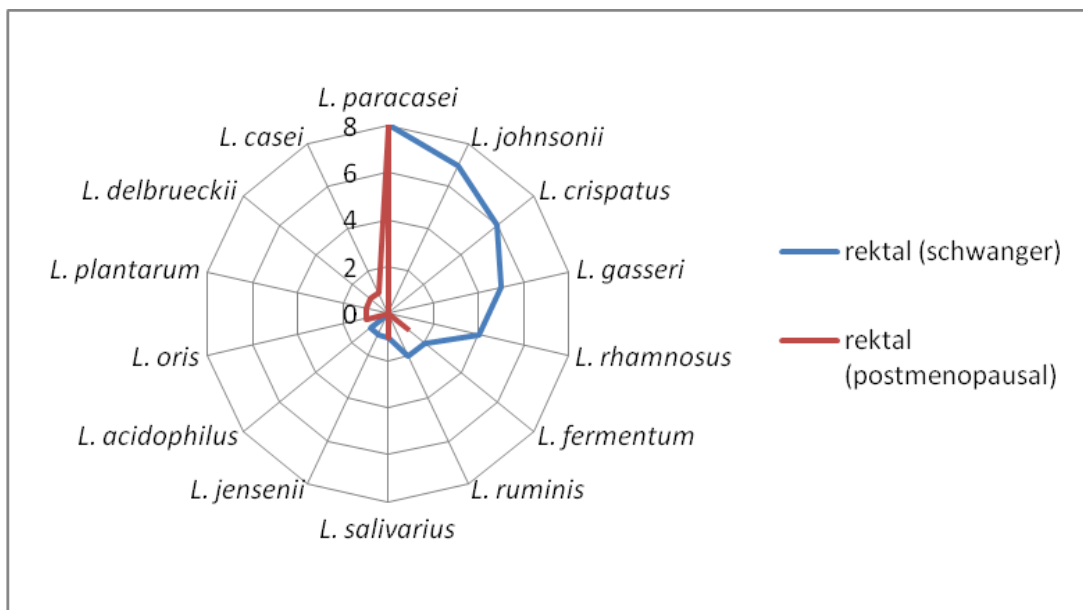


Abb. 5-10: Vergleich der kulturell erhaltenen rektalen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen in anderer graphischer Darstellung

Auch bei dieser PCR-DGGE kam es zu einer unterschiedlichen Häufigkeitsverteilung, wie in Tabelle 5-9 dargestellt ist.

Tab. 5-9: Vergleich der rektalen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen

	rektal (schwanger)	rektal (postmenopausal)
<i>L. crispatus</i>	19	0
<i>L. iners</i>	14	2
<i>L. reuteri</i>	12	1
<i>L. johnsonii</i> / <i>L. gasseri</i>	8	3
<i>L. casei</i> -Gruppe	6	4
<i>L. jensenii</i>	3	4
<i>L. plantarum</i>	2	1
<i>L. johnsonii</i>	2	0
<i>L. curvatus</i>	1	0
<i>L. salivarius</i>	0	2
<i>L. rhamnosus</i>	0	1
<i>L. sakei</i>	0	1
Summe	67	19

Die graphische Darstellung von Tabelle 5-9 findet sich in den Abbildungen 5-11 und 5-12.

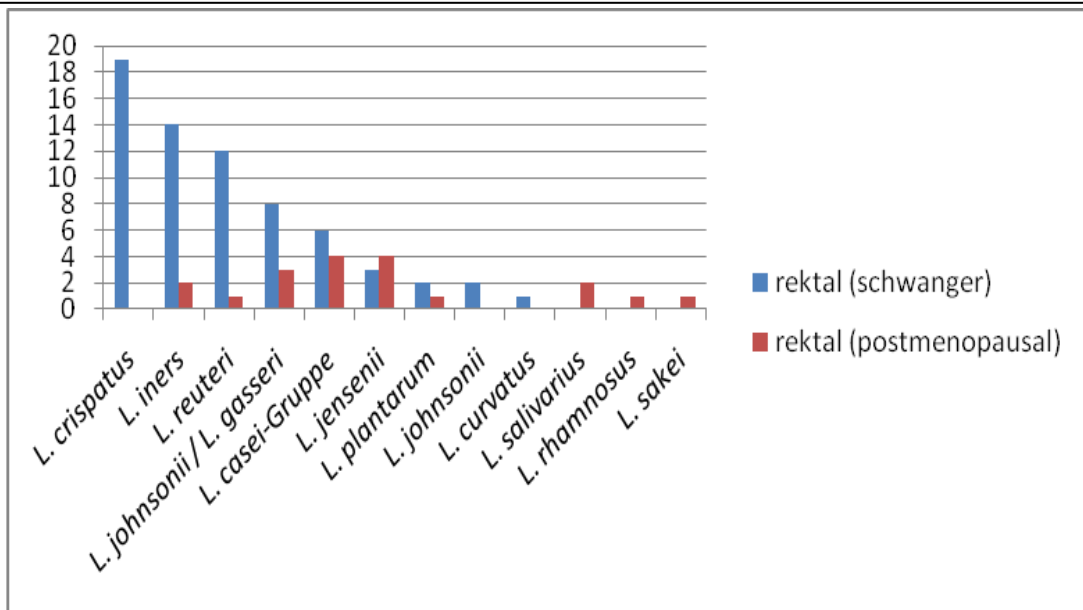


Abb. 5-11: Vergleich der rektalen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen

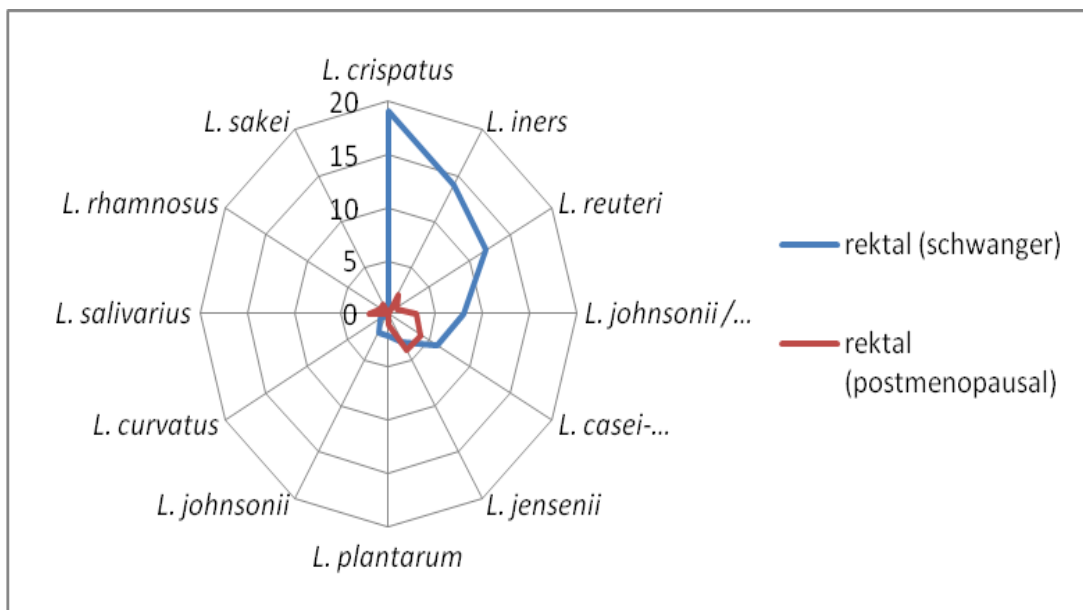


Abb. 5-12: Vergleich der rektalen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen in anderer graphischer Darstellung

Vaginale Abstriche:

Tabelle 5-10 zeigt die vaginale Mikrobiota von schwangeren im Vergleich zu postmenopausalen Probandinnen.

Tab. 5-10: Vergleich der kulturell erhaltenen vaginalen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen

	vaginal (schwanger)	vaginal (postmenopausal)
<i>L. crispatus</i>	12	2
<i>L. gasseri</i>	6	2
<i>L. paracasei</i>	3	4
<i>L. johnsonii</i>	6	0
<i>L. jensenii</i>	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	3	0
<i>L. acidophilus</i>	2	0
<i>L. curvatus</i>	2	0
<i>L. fermentum</i>	0	1
<i>L. plantarum</i>	0	1
Summe	37	11

Hier konnte bei keiner Lactobacillen-Art eine gleiche Häufigkeitsverteilung nachgewiesen werden.

Die graphische Darstellung wird in den Abbildungen 5-13 und 5-14 gezeigt.

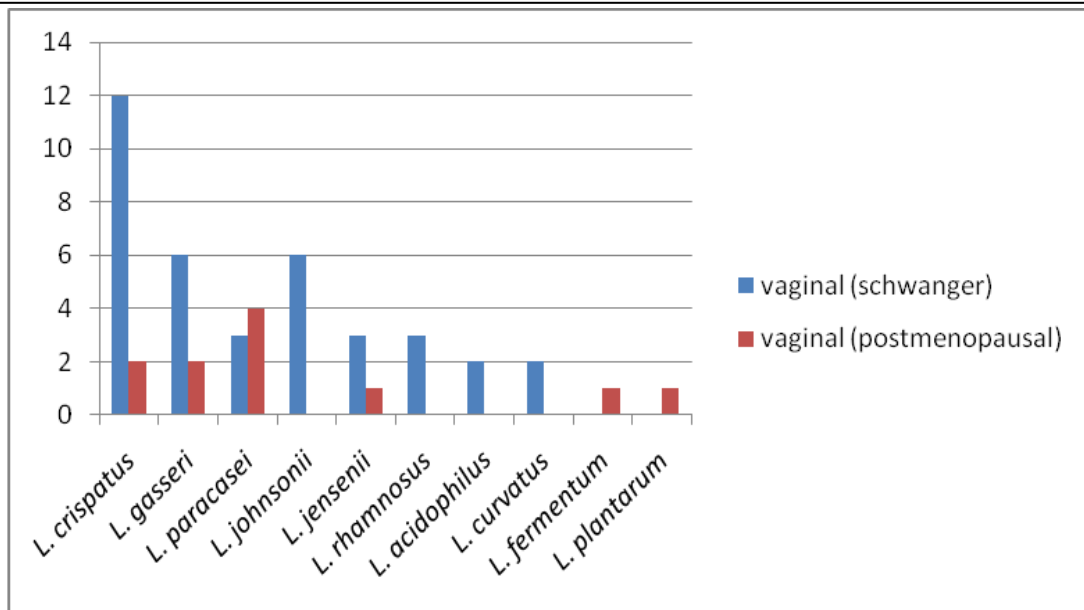


Abb. 5-13: Vergleich der kulturell erhaltenen vaginalen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen

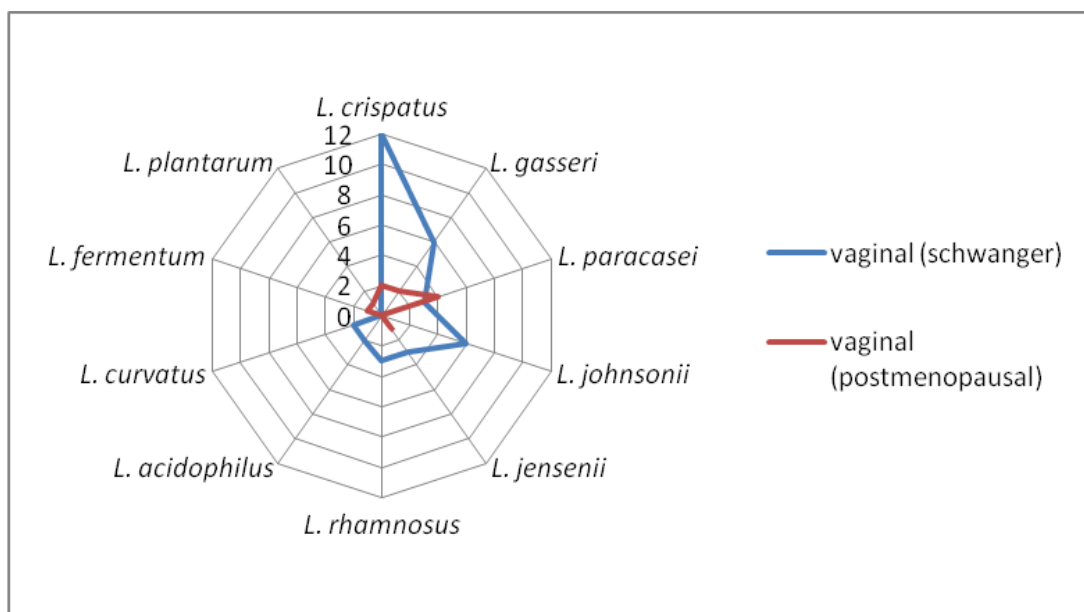


Abb. 5-14: Vergleich der kulturell erhaltenen vaginalen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen in anderer graphischer Darstellung

Die Häufigkeitsverteilung der Lactobacillen-Arten, die mittels PCR-DGGE ermittelt wurde, ist in Tabelle 5-11 dargestellt.

Tab. 5-11: Vergleich der vaginalen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen

	vaginal (schwanger)	vaginal (postmenopausal)
<i>L. iners</i>	16	4
<i>L. crispatus</i>	15	4
<i>L. jensenii</i>	3	7
<i>L. johnsonii</i> / <i>L. gasseri</i>	3	1
<i>L. helveticus</i>	1	3
<i>L. casei</i> -Gruppe	0	4
<i>L. reuteri</i>	2	1
<i>L. plantarum</i>	0	3
<i>L. gasseri</i>	0	3
<i>L. salivarius</i>	0	3
<i>L. johnsonii</i>	1	0
<i>L. amylovorus</i>	1	0
<i>L. delbrueckii</i>	0	1
Summe	42	34

Die Abbildungen 5-15 und 5-16 zeigen die zu Tabelle 5-11 gehörende graphische Darstellung.

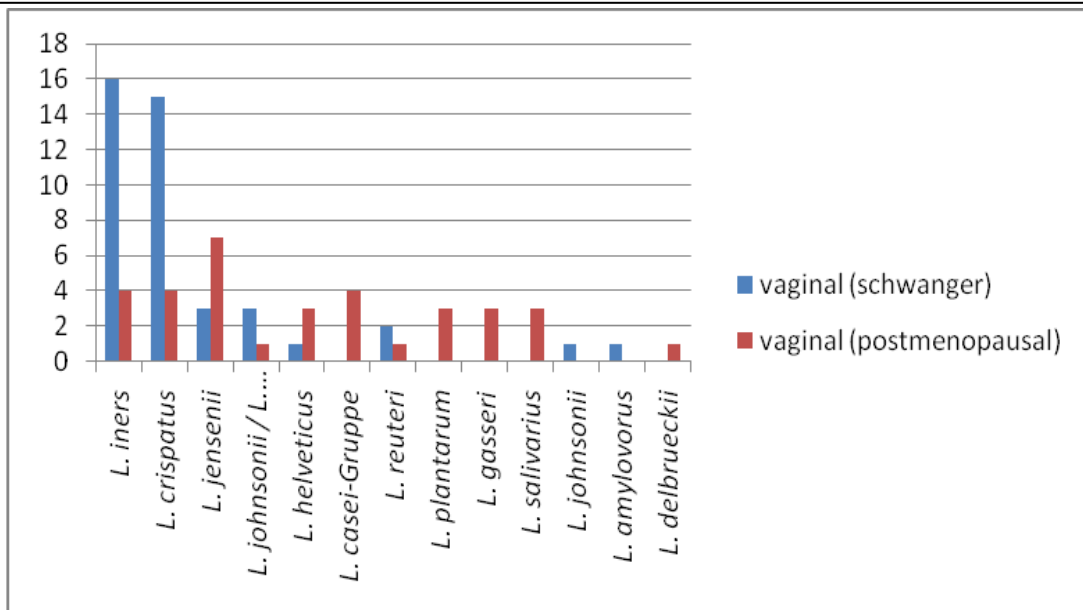


Abb. 5-15: Vergleich der vaginalen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen

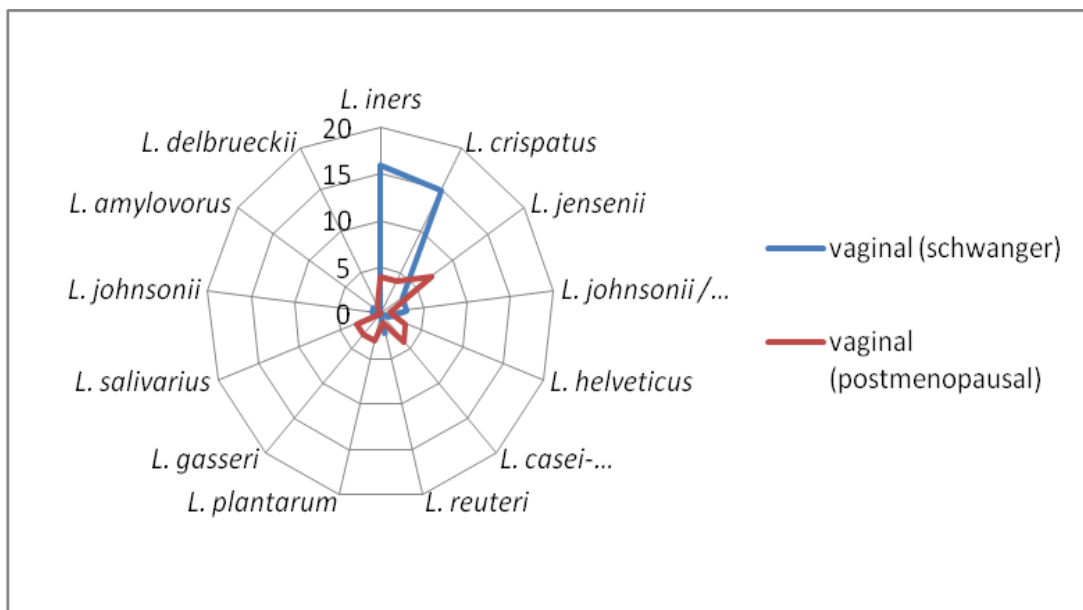


Abb. 5-16: Vergleich der vaginalen Ergebnisse der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen in anderer graphischer Darstellung

5.4. Zusammenfassung und Interpretation

In Tabelle 5-12 werden die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Abstrichsorten dargestellt.

Tab. 5-12: Zusammenhang der besiedelten Abstrichsorte als Zahlen und in Prozent (bezogen auf alle postmenopausalen Probandinnen)

	Kulturell, Multiplex- PCR [%]	Kulturell, Multiplex-PCR (in Zahlen)	PCR-DGGE [%]	PCR-DGGE (in Zahlen)
Oral – vaginal – rektal	3%	1	30%	9
Oral – vaginal	7%	2	43%	13
Vaginal – rektal	3%	1	40%	12
Oral - rektal	10%	3	33%	10

Kulturelle Methode:

Es wurde nur 1 von 30 Frauen (3%) an allen drei Abstrichsorten von derselben Lactobacillenart besiedelt. Beim Vergleich von Mund und Vagina ergab sich eine Verteilung von 7% (2 von 30 Frauen). Zwischen Vagina und Rektum, wo es die meiste Übereinstimmung laut vorausgegangener Studien geben sollte, zeigte sich ebenfalls nur eine Übereinstimmung von 3%. Vergleicht man den oralen mit dem rektalen Abstrichsort, so ergibt sich eine Übereinstimmung von 10 % - das entspricht 3 Frauen.

PCR-DGGE:

Die Ergebnisse, die mit dieser Methode erzielt wurden waren etwas detaillierter. 30% der Probandinnen (also 9 von 30 Frauen) waren an allen drei Abstrichsorten von den gleichen Lactobacillenarten besiedelt. Eine Übereinstimmung von 43% gab es zwischen Mund und Vagina, 40 % zwischen Vagina und Rektum und 33% zwischen Mund und Rektum.

Tabelle 5-13 und 5-14 zeigen den Vergleich zwischen Schwangeren und postmenopausalen Probandinnen in Bezug auf Abstrichsort und das Auftreten gleicher Lactobacillenarten.

Tab. 5-13: Verteilung der Lactobacillusarten, identifiziert durch Art-spezifische PCR in Prozent bei den schwangeren und postmenopausalen Frauen (bezogen auf alle Probandinnen)

Anzahl der Isolate	Oral		Vaginal		Rektal	
	Schwanger	Postmeno-pausal	Schwanger	Postmeno-pausal	Schwanger	Postmeno-pausal
0	50%	67%	17%	67%	20%	57%
1	30%	27%	53%	27%	47%	40%
2	10%	6%	20%	6%	27%	3%
3	7%	0%	10%	0%	3%	0%
4	3%	0%	0%	3%	3%	0%

Tab. 5-14: Verteilung der Lactobacillusarten, identifiziert durch PCR-DGGE in Prozent bei den schwangeren und postmenopausalen Frauen (bezogen auf alle 30 Probandinnen)

	PCR-DGGE	
	Schwanger	Postmenopausal
Oral – Vaginal – Rektal	17%	30%
Oral – Vaginal	30%	43%
Vaginal – Rektal	80%	40%
Oral - Rektal	53%	33%

Was im Zuge dieser Arbeit deutlich gezeigt werden konnte, ist, dass sich das Vorkommen an Lactobacillen mit dem Alter reduziert. Die schwangeren Probandinnen wiesen eine deutlich höhere Zahl an Lactobacillen, sowie größere Diversität auf.

Um gezielt Probiotika für die Aufbesserung der vaginalen Mikrobiota entwickeln zu können, ist es unerlässlich zu klären, wie es zur Besiedelung der Vagina mit Lactobacillen kommt.

In einer Studie von El Aila et al., 2009 wurde gezeigt, dass 44,4% der identifizierten Lactobacillus-Arten sowohl die Vagina als auch das Rektum besiedelten. Es ist denkbar, dass die rektale Kolonisierung durch Lactobacillen

als Reservoir für die Aufrechterhaltung einer normalen Vaginalflora dient. [El AILA, 2009]

Das konnte in dieser Arbeit nur teilweise nachgewiesen werden. Wie aus Tabelle 5-12 hervorgeht, konnte bei der kulturellen Methode keine Übereinstimmung der Lactobacillen zwischen Vagina und Rektum hergestellt werden. Das ausgezeichnete Wachstum von Enterococcen auf MRS-Agar könnte ein möglicher Grund für dieses Resultat sein.

Die Ergebnisse, die durch PCR-DGGE erhalten wurden, betragen 43%. Das stimmt gut mit den Ergebnissen von El Aila et al. überein.

Worin liegt nun der Grund für eine Abnahme der Lactobacillen mit zunehmendem Alter? In einer Studie von Petricevic et al., 2008, wird darauf hingewiesen, dass Östrogen die Kolonisierung der Vagina mit Lactobacillen fördert. Die urogenital Atrophie, die auf die Menopause folgt, ist mit einem Absinken der Östrogenausscheidung assoziiert, was in weiterer Folge zum Abbau von Lactobacillen, der Erhöhung des pH Wertes und einer erhöhten Kolonisierung mit Enterococcen führt [PETRICEVIC, 2008]. Der Nachweis einer erhöhten Kolonisierung mit Enterococcen konnte im Zuge dieser Arbeit erbracht werden.

Die Verabreichung oraler Probiotika, wie *L. rhamnosus* GR-1 und *L. reuteri* RC-14 können eine große Hilfe für die Verbesserung der Qualität der vaginalen Mikrobiota sein und auch die urogenitale Gesundheit steigern. [PETRICEVIC, 2008]

Nicht nur Probiotika, sondern auch die Behandlung mit Hormonen soll die Vaginalmikrobiota verbessern.

Eine frühere Studie mit 59 postmenopausalen Japanerinnen zeigte, dass beispielsweise die Behandlung mit Estriol das Lactobacillen-Vorkommen in der Vagina kurzfristig verbessern kann. Auch wenn die Hormon Ersatz Therapie (hormone replacement therapy, HRT) früher als Gesundheitsrisiko betrachtet wurde, so konnte doch gezeigt werden, dass sie zumindest den positiven Effekt hat, das Lactobacillen-Vorkommen in der Vagina zu verbessern. [DEVILLARD, 2004]

Der Einsatz und die Entwicklung von Probiotika für die Stabilisierung der vaginalen Mikrobiota postmenopausaler Frauen sind von großer Bedeutung für

die medizinische Forschung. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse liefern dafür eine wichtige Grundlage.

Es konnte gezeigt werden, dass bei den postmenopausalen Probandinnen zwar die oralen und rektalen Keimzahlwerte der Milchsäurebakterien sehr hoch waren, die Diversität der nachgewiesenen oralen, vaginalen und rektalen Lactobacillenarten aber geringer war als bei den schwangeren Frauen.

Diese Beobachtung führt zu dem Schluss, dass sich MRS Agar nicht nur gut für das Wachstum von Lactobacillen eignet, sondern auch für einige weitere Milchsäurebakterien und Hefen ein gutes Nährmedium darstellt.

Die Lactobacillen-negativen Isolate der postmenopausalen Frauen konnten größtenteils mittels PCR oder Sequenzierung als Enterococcen identifiziert werden.

Wie in Tabelle 5-14 dargestellt, zeigte sich durch die molekularbiologische Untersuchung, dass 40% der postmenopausalen Probandinnen und sogar 80% der schwangeren Frauen in Vagina und Rektum von der gleichen Lactobacillenart besiedelt wurden.

Eine Übereinstimmung der Lactobacillenarten zwischen Mundhöhle und Rektum konnte bei den Schwangeren in 53 %, bei den postmenopausalen Frauen in 33 % der Fälle nachgewiesen werden. Das zeigt, dass Milchsäurebakterien in der Lage sind den Übergang von der Mundhöhle zum Rektum zu überleben.

Das bietet großes Potential für die orale Applikation von Probiotika zur Aufbesserung der Lactobacillen-Mikrobiota postmenopausaler Frauen.

6. Zusammenfassung

Milchsäurebakterien, insbesondere Lactobacillen, spielen sowohl in der Lebensmittelmikrobiologie als auch für die menschliche Gesundheit eine wichtige Rolle. Der Einsatz von Probiotika, die erwiesenermaßen einen positiven Effekt auf die menschliche Gesundheit ausüben, wird immer „beliebter“ und die verfügbaren wissenschaftlichen Studien zu diesem Thema immer zahlreicher.

Lactobacillen besiedeln von Natur aus das „Habitat“ Mensch, besonders häufig an drei Stellen, nämlich in der Mundhöhle, der Vagina und dem intestinal-rektalen Bereich. Gerade die Lactobacillen der Vagina sind für die weibliche Gesundheit essentiell. Allerdings reduziert sich das Vorkommen dieser Bakterien mit zunehmendem Alter. Um gezielt spezielle Probiotika dafür entwickeln zu können, ist die Untersuchung der vaginalen Mikrobiota von postmenopausalen Frauen und auch der Vergleich mit jener von Schwangeren von großem Interesse. Entsprechende Änderungen in Keimzahl und Diversität der Mikrobiota konnten in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden Abstriche von 30 Probandinnen, im Alter zwischen 55 und 65 Jahren untersucht. Bei den Abstrich-Orten handelte es sich um den Mund, die Vagina und das Rektum. Von jedem Ort wurden zeitgleich je zwei Abstriche genommen, welche dann auf zwei unterschiedliche Methoden auf das Vorhandensein von Lactobacillen untersucht und anschließend mit der Mikrobiota von schwangeren Frauen [KRONDORFER, 2008] verglichen wurden. Bei dem mittels kultureller Methoden untersuchten Abstrich 1 wurde zunächst mit Hilfe des Koch'schen Plattenverfahrens die Keimzahl bestimmt. Anschließend wurden die unterschiedlichen Kolonieformen subkultiviert. Um diese Einzelkolonien zu identifizieren, wurde dann zunächst eine Gattungsspezifische PCR durchgeführt, gefolgt von einer Multiplex-PCR.

L. paracasei war die dominierende Art unter den kulturellen Isolaten, gefolgt von *L. plantarum* und *L. gasseri*.

Bei der zweiten Methode (Abstrich 2) handelte es sich um rein molekularbiologische Verfahren. Die DNA von Abstrich 2 wurde gleich direkt isoliert und mittels PCR-DGGE und anschließender Sequenzierung identifiziert.

Die drei am häufigsten vorkommenden Arten waren *L. casei*/*L. paracasei*, *L. jensenii* und *L. gasseri* bzw. *L. salivarius*.

Im Vergleich mit den schwangeren Probandinnen zeigte sich deutlich, dass sich sowohl die Anzahl der Lactobacillen mit dem Alter verringert, als auch, dass sich die Mikrobiota in ihrer Zusammensetzung sehr verändert hatte.

7. Abstract

Lactic acid bacteria, lactobacilli in particular, play a major part in food-microbiology but are also of extreme importance for human health. The use of probiotics is getting more and more popular, because of its positive effect on human health. According to this proven fact scientific studies become more usual. Lactobacilli inhabit the human habitat inherently. The three key areas are: oral cavity, vagina and intestinal-rectum. Lactobacilli of the vagina are essential for female health, but their number decreases with growing age. The examination of the vaginal microbiota of postmenopausal women in composition to pregnant women helps to develop specific probiotics.

In course of this thesis smears of thirty subjects between 55 and 65 years were examined. The smears were taken from mouth, vagina and rectum. Two smears of each part were taken and examined using two different methods, in order to locate lactobacilli which were compared to them of pregnant women afterwards. [KRONDORFER, 2008]

Using the surface plating method, the bacterial count of smear 1 was quantified and afterwards sub-cultivated in different forms of colonies.

When identifying single colonies, a species-specific PCR followed by a multiplex PCR was executed. It revealed that *L. paracasei* dominates all cultural isolates, followed by *L. plantarum* and *L. gasseri*.

The DNA of smear 2 was isolated and identified directly via PCR-DGGE followed by sequencing. This time *L. casei/L. paracasei*, *L. jensenii* and *L. gasseri/L. salivarius* were the most frequently detected species.

Comparing to pregnant women the test revealed that the number of lactobacilli decreased with age increase, as well as the composition of microbiota changed clearly.

8. Literatur

AGUIRRE M. und **COLLINS M.D.:** Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology* 75, pp. 95-107 (1993)

ANTONIO M.A.D., MEYN L.A., MURRAY P.J., BUSSE B. und **HILLIER S.L.:** Vaginal colonization by probiotic *Lactobacillus crispatus* CTV-05 is decreased by sexual activity and endogenous Lactobacilli. *Journal of Infectious Diseases* 199, pp. 1506-1513 (2009)

ANUKAM K.C. und **REID G.:** Organisms associated with bacterial vaginosis in Nigerian women as determined by PCR-DGGE and 16S rRNA gene sequence. *African Health Science* 7 (2), pp. 68-72 (2007)

BARKER K.: Das Cold Spring Harbor Laborhandbuch für Einsteiger. 1. Auflage, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München (2006)

BÄCKHED F., LEY R.E., SONNENBURG J.L., PETERSON D.A. und **GORDON J.I.:** Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, pp.1915-1920 (2005)

BERNARDEAU M., VERNOUX J.P., HENRI-DUBERNET S.H. und **GUÉGUEN M.:** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126 (3), pp.278-285 (2008)

BERNARDEAU M., GUGUEN M. und **VERNOUX J.P.:** Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Review* 30, pp. 487-513 (2006)

ÇAGLAR E., TOPCUOĞLU N., ÇILDIR S. K., SANDALLI N. und **KULEKCI G.:** Oral colonization by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 after exposure to probiotics. *International Journal of Paediatric Dentistry* 19, pp. 377-381 (2009)

CANCHAYA C., CLAEISSON M.J., FITZGERALD G.F., van SINDEREN D. und **O'TOOLE P.W.:** Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology* 152, pp. 3185–3196 (2006)

CANNON J.P., LEE T.A., BOLANOS J.T. und **DANZINGER L.H.:** Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: A retrospective review of over 200 cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease* 24, pp. 31-40 (2005)

DEVILLARD E., BURTON J.P., HAMMOND Jo-Anne, LAM D. und REID G.: Novel insight into the vaginal microflora in postmenopausal women under hormone replacement therapy as analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 117, pp. 76-81 (2004)

DONATI L., Di VICO A., NUCCI M., QUAGLIOZZI L., SPAGNUOLO T., LABIANCA A., BRACAGLIA M., IANNIELLO F., CARUSO A. und PARADISI G.: Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 281, pp. 589-600 (2010)

DUTKA-MALEN S., EVERS S. und COURVALIN P.: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (1), pp. 24-27 (1995)
Erratum. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (5), p. 1434 (1995)

EL AILA N.A., TENCY I., CLAEYS G., VERSTRAELEN H., SAERENS B., LOPES dos SANTOS SANTIAGO G., De BACKER E., COOLS P., TEMMERMAN M., VERHELST R. und VANECHOUTTE M.: Identification and genotyping of bacteria from paired vaginal and rectal samples from pregnant women indicates similarity between vaginal and rectal microflora. *BMC Infectious Diseases* 9, pp. 167-181 (2009)

ERCOLINI D.: PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56, pp. 297-314 (2004)

EUZÉBY J. P.: List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Society for Systematic and Veterinary Bacteriology, 1997

ESCHENBACH D. A., DAVICK P. R., WILLIAMS B. L., KLEBANOFF S. J., YOUNG-SMITH K., CRITCHLOW C. M. und HOLMES K. K.: Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology* 27, pp. 251 – 256 (1989)

FAKHRY S., MANZO N., D'APUZZO E., PIETRINI L., SORRENTINI I., RICCA E., De FELICE M. und BACCIGALUPI L.: Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. *Research in Microbiology* 160, pp. 817-823 (2009)

FALSEN E., PASCUAL C., SJÖDÉN B., OHLÉN M. und COLLINS M.D.: Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: Description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, pp. 217 – 221 (1999)

FELIS G.E. und DELLAGLIO F.: Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 8, pp. 44–61 (2007)

GIL N.F., MARTINEZ R.C.R., GOMES B.C., NOMIZO A. und De MARTINIS E.C.P.: Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. *Brazilian Journal of Microbiology* 41 (1), pp. 6-14 (2010)

GUARNER F. und SCHAAFSMA G.J.: Short communication Probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 39, pp. 237-238 (1998)

HAMMES W.P. und HERTEL C.: The genera *Lactobacillus* und *Carnobacterium*. *Prokaryotes* 4, pp. 320–403 (2006)

HILL, D.A. und ARTIS D.: Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis. *Annual Review of Immunology* 28, pp. 623-667 (2010)

JIMÉNEZ E., FERNÁNDEZ L., MALDONADO A., MARTÍN R., OLIVARES M., XAUS J. und RODRÍGUEZ J.M.: Oral Administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (15), pp. 4650-4655 (2008)

KLEEREBEZEM M., HOLS P., BERNARD E., ROLAIN T., ZHOU M., SIEZEN R.J. und BRON P.A.: The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews* 34, pp. 199-230 (2010)

KÖLL P., MÄNDAR R., MARCOTTE H., LEIBUR E., MIKELSAAR M. und HAMMARSTRÖM L.: Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiology and Immunology* 23, pp.139 – 14 (2008).

KRONDORFER I.: Molekulare Analyse der Biodiversität von Lactobacillen in verschiedenen humanen Habitaten. (2008)

LEE J.-H., KIM T.-W., LEE H., CHANG H.C. und KIM H.-Y.: Determination of microbial diversity in *meju*, fermented cooked soya beans, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology* 51, pp. 388-394 (2010)

LIONG M.-T.: Probiotics: A critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemics, and perimenopausal treatments. *Nutrition Reviews* 65 (7), pp. 316-328 (2007)

MARTIN R. und SUÁREZ J.E.: Biosynthesis and degradation of H₂O₂ by vaginal lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (2), pp. 400-405 (2010)

MARTINEZ R.C.R., FRANCESCHINI S.A., PATTA M.C., QUINTANA S.M., NUNES Á.C., MOREIRA J.L.S., ANUKAM K.C., REID G. und De MARTINIS E.C.P.: Analysis of vaginal Lactobacilli from healthy and infected brazilian women. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (14), pp. 4539-4542 (2008)

MERK K., BORELLI C. und KORTING H.C.: Lactobacilli – bacteria-host interactions with special regard to the urogenital tract. *International Journal of Medical Microbiology* 295, pp. 9-18 (2005)

MEURMAN J.H., TARKKILA L. und TIITINEN A.: The menopause and oral health. *Maturitas* 63, pp. 56-62 (2009)

MUENCH D.F., KUCH D.J., WU H., BEGUM A.A., VEIT S.J., PELLETIER M.-E., SOLER-GARCÍA Á.A. und JERSE A.E.: Hydrogen peroxide-producing Lactobacilli inhibit Gonococci *in vitro* but not during experimental genital tract infection. *Journal of Infectious Disease* 199, pp. 1369-1378 (2009)

MULDER I.E., SCHMIDT B., STOKES C.R., LEWIS M., BAILEY M., AMINOV R.I., PROSSER J.I., GILL B.P., PLUSKE J.R., MAYER C.-D., MUSK C.C. und KELLY D.: Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biology* 7, pp. 79-99 (2009)

NUGENT R.P., KROHN M.A. und HILLIER S.L.: Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *Journal of Clinical Microbiology* 29 (2), pp. 297-301 (1991)

OCAÑA V. S., PESCE DE RUIZ HOLGADO A. A. und NADER-MACÍAS M. E.: Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. *Current Microbiology* 38, pp. 279 – 284 (1999)

OXOID (Hrsg.): OXOID Handbuch, 2003

PETRICEVIC L., UNGER F.M., VIERNSTEIN H. und KISS H.: Randomized, double-blind, placebo-controlled study of oral lactobacilli to improve the vaginal flora of postmenopausal women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 141, pp. 54-57 (2008)

PICHHARDT K.: Lebensmittelmikrobiologie, Grundlagen für die Praxis. 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York (1998)

QIN J., LI R., RAES J., ARUMUGAM M., BURGDORF K.S., MANICHANH C., NIELSEN T., PONS N., LEVENEZ F., YAMADA T., MENDE D.R., LI J., XU J., LI S., LI D., CAO J., WANG B., LIANG H., ZHENG H., XIE Y., TAP J., LEPAGE P., BERTALAN M., BATTO J.-M., HANSEN T., Le PASLIER D., LINNEBERG A., NIELSEN H.B., PELLETIER E., RENAULT P., SICHERITZ-PONTEN T.,

TURNER K., ZHU H., YU C., LI S., JIAN M., ZHOU Y., LI Y., ZHANG X., LI S., QIN N., YANG H., WANG J., BRUNAK S., DORÈ J., GUARNER F., KRISTIANSEN K., PEDERSEN O., PARKHILL J., WEISSENBAACH J., MetaHIT Consortium, BORK P., EHRLICH S.D. und WANG J.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* Vol. 464, pp. 59-67 (2010)

RINTTILÄ T., KASSINEN A., MALINEN E., KROGIUS L. und PALVA A.: Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 97, pp. 1166-1177 (2004)

ROCHAT T., GRATADOUX J.-J., GRUSS A., CORTIER G., MAGUIN E., LANGELLA P. und van de GUCHTE M.: Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (8), pp. 5143-5149 (2006)

SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B. und ERlich H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, pp. 487–491 (1988)

SANDERS M.E.: Lactic acid bacteria and human health. In: Fuller R., Heidt P.J., Rusch V., Van der Waaij D. (eds) *Probiotics: prospects of use in opportunistic infections*. Herborn-Dill, Germany, Institute for Microbiology and Biochemistry, pp. 126-140 (1995)

SANDERS M.E.: Probiotics: definition, sources, selection and uses. *Clinical Infectious Diseases* 46, pp. 58-61 (2008)

SCHILLINGER U. und HOLZAPFEL W.H.: Culture media for lactic acid bacteria. In: CORRY J. E. L., CURTIS G. D. W. und R. M. BAIRD (Hrsg.): *Handbook of culture media for food microbiology* 37, Chapter 8, pp. 127 – 145 (2003)

SHIN L.Y. und KAUL R.: Stay it with flora: Maintaining vaginal health as a possible avenue for prevention of human immunodeficiency virus acquisition. *Journal of Infectious Diseases* 197, pp. 1355-1357 (2008)

SONG Y.-L., KATO N., MATSUMIYA Y., LIU C.-X., KATO H. und WANTANBE K.: Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from japanese women and newborn infants. *Journal of Clinical Microbiology* 37, pp. 3062 – 3064 (1999)

SONG Y.-L., KATO N., LIU C.-X., MATSUMIYA Y., KATO H. und WANTANBE K.: Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters* 187, pp. 167–173 (2000)

STILES M.E. und **HOLZAPFEL W.H.:** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology 36, pp. 1–29 (1997)

STRUS M., BRZYCHZY-WLOCH M., GOSIEWSKI T., KOCHAN P. und **HECZKO P. B.:** The *in vitro* effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. FEMS Immunology and Medical Microbiology 48, pp. 56 – 63 (2006)

TIAN Y., HE X., TORRALBA M., YOOSEPH S., NELSON K.E., LUX R., McLEAN J.S., YU G. und **SHI W.:** Using DGGE profiling to develop a novel culture medium suitable for oral microbial communities. Molecular oral Microbiology 25, pp.357-367 (2010)

VAUGHAN E.E., de VRIES M.C., ZOETENDAL E.G., BEN-AMOR K., AKKERMANS A.D.L. und **de VOS W.M.:** The intestinal LABs. Antonie van Leeuwenhoek 82, pp. 341-352 (2002)

VERSTRAELEN H., VERHELST R., CLAEYS G., De BACKER E., TEMMERMAN M. und **VANEECHOUTTE M.:** Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. BMC Microbiology 9, pp. 116-126 (2009)

WALTER J., HERTEL C., TANNOCK G.W., LIS C.M., MUNRO K. und **HAMMES W.P.:** Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 67, pp. 2578–2585 (2001)

WILHELM J.: PCR: Die biochemische Kopiermaschine. Marktübersicht, BIOSpektrum 2/05 11. Jahrgang

WHO: Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, 30 April - 1 May 2002

9. Anhang

9.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

P31	$2,3 \cdot 10^4$	$> 3 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$	P31M1A	Streptococcus mitis	P31V1A	E. faecalis	P31R1A	E. durans	P31M2	/	P31V2	L. iners	P31R2	L. gasseri L. johnsonii
				P31M1B	Enterococcus ssp.	P31V1B	L. paracasei	P31R1B	Enterococcus ssp.						
				P31M1C	/	P31V1C	E. faecalis	P31R1C	E. faecalis						
				P31M1D	Enterococcus ssp.			P31R1D	E. faecalis						
P32	$1,8 \cdot 10^5$	$> 3 \cdot 10^6$	$> 3 \cdot 10^6$	P32M1A	L. gasseri	P32V1A	E. faecalis	P32R1A	E. faecium	P32M2	L. gasseri L. johnsonii L. fermentum L. salivarius L. casei/paracasei L. reuteri	P32V2	L. reuteri	P32R2	/
				P32M1B	L. paracasei	P32V1B	E. faecalis	P32R1B	L. paracasei						
				P32M1D	L. paracasei	P32V1C	E. faecalis	P32R1C	L. paracasei						
P33	$3,2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^6$	P33M1A	Streptococcus mutans	P33V1A	L. paracasei	P33R1A	L. oris	P33M2	L. gasseri L. johnsonii L. reuteri	P33V2	L. helveticus L. jensenii L. crispatus	P33R2	L. gasseri L. johnsonii
				P33M1B	/	P33V1B	E. faecalis	P33R1B	L. delbrückii						
				P33M1C	/	P33V1C	E. faecalis	P33R1C	L. delbrückii						
				P33M1D	L. gasseri			P33R1D	E. faecium						
				P33M1E	/			P33R1E	Enterococcus ssp.						
P34	$2 \cdot 10^4$	$> 3 \cdot 10^6$	$> 3 \cdot 10^6$	P34M1A	L. delbrückii	P34V1A	L. gasseri	P34R1A	Enterococcus ssp.	P34M2	L. gasseri L. johnsonii L. casei/paracasei	P34V2	L. gasseri L. johnsonii	P34R2	L. gasseri L. johnsonii
				P34M1B	Enterococcus ssp.	P34V1B	Enterococcus ssp.	P34R1B	L. paracasei						
				P34M1C	/	P34V1C	E. faecium	P34R1C	E. hirae						
				P34M1D	/	P34V1D	L. gasseri								
P35	$4 \cdot 10^4$	0	0			P35V1A	L. crispatus			P35M2	L. rhamnosus	P35V2	L. iners	P35R2	/
P36	0	$> 3 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$			P36V1A	E. faecalis	P36R1A	E. faecium	P36M2	/	P36V2	L. crispatus	P36R2	L. iners
						P36V1B	E. faecalis	P36R1B	Enterococcus ssp.						
						P36V1C	E. faecalis	P36R1C	E. faecalis						
								P36R1D	E. faecalis						
								P36R1E	E. faecalis						

P37	0	0	1,5 * 10 ⁶			P37V1A	Streptococcus anginosus			P37M2	/	P37V2	L. jensenii	P37R2	L. jensenii
P38	9,1 * 10 ⁴	0	5,9 * 10 ⁴					P38R1A	L. fermentum	P38M2	/	P38V2	/	P38R2	/
								P38R1B	Enterococcus ssp.						
								P38R1C	Enterococcus ssp.						
								P38R1D	Enterococcus ssp.						
								P38R1E	/						
P39	3,8 * 10 ⁴	> 3 * 10 ⁶	1,2 * 10 ⁵			P39V1A	Enterococcus ssp.	P39R1A	Enterococcus ssp.	P39M2	/	P39V2	/	P39R2	/
						P39V1B	Enterococcus ssp.	P39R1B	Enterococcus ssp.						
								P39R1C	Enterococcus ssp.						
								P39R1D	Enterococcus ssp.						
								P39R1E	Enterococcus ssp.						
								P39R1F	L. casei						
P40	9,2 * 10 ⁴	1,0 * 10 ⁶	5,6 * 10 ⁴	P40M1A	L. plantarum					P40M2	/	P40V2	L. helveticus L. jensenii	P40R2	L. jensenii
				P40M1B	/										
				P40M1C	E. faecalis										
				P40M1D	E. faecalis										
				P40M1E	E. faecalis										
				P40M1F	E. faecalis										
P41	1,5 * 10 ⁵	0	2,8 * 10 ⁴					P41R1A	Streptococcus agalactiae	P41M2	L. helveticus L. jensenii	P41V2	L. jensenii	P41R2	L. jensenii L. iners
								P41R1B	/						
P42	6,8 * 10 ⁵	1,2 * 10 ⁵	3,2 * 10 ⁵	P42M1A	keine DNA	P42V1A	E. faecalis	P42R1A	L. paracasei	P42M2	L. iners L. jensenii	P42V2	L. jensenii	P42R2	L. rhamnosus L. reuteri L. jensenii
				P42M1B	L. paracasei	P42V1B	Enterococcus ssp.	P42R1B	Enterococcus ssp.						
						P42V1C	Enterococcus ssp.	P42R1C	Enterococcus ssp.						
						P42V1D	Enterococcus ssp.	P42R1D	Enterococcus ssp.						
								P42R1E	Enterococcus ssp.						

P43	3,6 * 10 ⁶	2,5 * 10 ⁶	2,5 * 10 ⁶	P43M1A	L. paracasei	P43V1A	L. plantarum			P43M2	L. casei/paracasei L. helveticus L. rhamnosus	P43V2	L. casei/paracasei L. crispatus L. helveticus	P43R2	/
						P43V1B	L. paracasei								
						P43V1C	L. paracasei								
						P43V1D	L. paracasei								
P44	0	>3*10 ⁶	1,7*10 ⁶			P44V1A	E. faecium	P44R1A	Enterococcus ssp.	P44M2	/	P44V2	L. gasseri L. delbrückii	P44R2	/
						P44V1B	E. faecium	P44R1B	Enterococcus ssp.						
						P44V1C	E. faecium	P44R1C	/						
								P44R1D	L. paracasei						
P45	2,1 * 10 ⁵	1,3*10 ⁵	2,7*10 ⁵	P45M1B	/	P45V1B	L. jensenii	P45R1B	Enterococcus ssp.	P45M2	/	P45V2	L. iners	P45R2	/
				P45M1C	Enterococcus ssp.			P45R1C	Enterococcus ssp.						
								P45R1D	/						
								P45R1E	Enterococcus ssp.						
P46	1,0 * 10 ⁵	2,2*10 ⁵	1 * 10 ⁴	P46M1A	Enterococcus ssp.	P46V1C	/			P46M2	L. crispatus L. gasseri L. reuteri	P46V2	L. gasseri L. crispatus	P46R2	/
				P46M1B	Enterococcus ssp.										
P47	4 * 10 ⁴	3,1 * 10 ⁴	1 * 10 ³	P47M1B	Streptococcus sanguinis	P47V1E	L. crispatus			P47M2	/	P47V2	L. jensenii	P47R2	/
P48	3 * 10 ⁴	1 * 10 ⁴	>3 * 10 ⁶	P48M1A	Streptococcus sobrinus	P48V1A	Enterococcus ssp.	P48R1A	Enterococcus ssp.	P48M2	L. salivarius	P48V2	L. salivarius	P48R2	L. salivarius
				P48M1C	Enterococcus ssp.	P48V1B	/	P48R1B	Enterococcus ssp.						
				P48M1D	Enterococcus ssp.	P48V1C	Enterococcus ssp.	P48R1D	Enterococcus ssp.						
				P48M1E	/	P48V1D	Enterococcus ssp.								
				P48M1F	Enterococcus ssp.	P48V1E	Enterococcus ssp.								

P49	$>3 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^4$	$>3 \cdot 10^6$	P49M1A	Streptococcus mutans	P49V1A	E. faecalis	P49R1A	Streptococcus anginosus	P49M2	L. salivarius	P49V2	L. salivarius	P49R2	L. salivarius
				P49M1B	Enterococcus ssp.	P49V1B	Enterococcus ssp.	P49R1B	/						
				P49M1C	Enterococcus ssp.	P49V1C	Enterococcus ssp.								
				P49M1D	Enterococcus ssp.	P49V1D	Enterococcus ssp.								
				P49M1E	Enterococcus ssp.	P49V1E	Enterococcus ssp.								
				P49M1F	Enterococcus ssp.	P49V1F	Enterococcus ssp.								
P50	$2 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	$>3 \cdot 10^6$	P50M1B	Enterococcus ssp.	P50V1A	Actinomyces neuii	P50R1B	Enterococcus ssp.	P50M2	/	P50V2	/	P50R2	/
				P50M1C	L. paracasei	P50V1C	/								
						P50V1D	Enterococcus ssp.								
						P50V1E	Enterococcus ssp.								
P51	$1 \cdot 10^4$	$4,8 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$	P51M1A	Streptococcus crispatus	P51V1A	E. coli	P51R1A	Streptococcus anginosus	P51M2	/	P51V2	L. salivarius	P51R2	/
				P51M1B	/	P51V1C	/	P51R1B	Enterococcus ssp.						
				P51M1E	/	P51V1D	/	P51R1C	Enterococcus ssp.						
						P51V1E	Enterococcus ssp.	P51R1D	Enterococcus ssp.						
						P51V1F	/								
P52	$2,1 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^6$	P52M1A	Streptococcus mutans	P52V1C	Klebsiella pneumoniae	P52R1B	Enterococcus ssp.	P52M2	/	P52V2	/	P52R2	/
				P52M1B	Enterococcus ssp.	P52V1D	/	P52R1C	/						
				P52M1D	Enterococcus ssp.			P52R1D	Enterococcus ssp.						
				P52M1E	/			P52R1E	L. salivarius						
				P52M1F	Enterococcus ssp.										
P53	$>3 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$	P53M1A	L. paracasei	P53V1A	E. faecalis	P53R1A	Enterococcus ssp.	P53M2	Leuconostoc gasicomitatum L. casei/L. paracasei Leuconostoc pseudomesenteroides	P53V2	L. plantarum	P53R2	/
				P53M1B	Enterococcus ssp.	P53V1B	L. paracasei	P53R1B	Enterococcus ssp.						
				P53M1C	Enterococcus ssp.	P53V1C	Enterococcus ssp.	P53R1C	L. paracasei						
				P53M1D	/										
P54	$>3 \cdot 10^6$	0	$1,8 \cdot 10^6$	P54M1A	L. plantarum			P54R1A	L. paracasei	P54M2	L. plantarum	P54V2	L. plantarum L. jensenii	P54R2	L. jensenii
				P54M1C	/			P54R1B	E. avium						
				P54M1D	L. plantarum			P54R1C	L. paracasei						
								P54R1D	Enterococcus ssp.						
								P54R1E	Enterococcus ssp.						

P55	7,7 * 10 ⁵	6,2 * 10 ⁵	1 * 10 ³	P55M1A	Streptococcus mitis	P55V1A	L. gasseri	P55R1A	L. paracasei	P55M2	L. plantarum	P55V2	L. gasseri L. iners L. plantarum	P55R2	L. plantarum
				P55M1B	/	P55V1B	Enterococcus ssp.	P55R1B	Enterococcus ssp.						
				P55M1C	/	P55V1C	L. gasseri	P55R1C	Enterococcus ssp.						
				P55M1D	/	P55V1D	E. faecalis	P55R1D	/						
				P55M1E	/	P55V1E	Enterococcus ssp.	P55R1E	/						
				P55M1F	/			P55R1F	Enterococcus ssp.						
				P55M1G	/										
				P55M1H	/										
P56	2,1 * 10 ⁴	2 * 10 ³	1,1 * 10 ⁶	P56M1A	/	P56V1A	E. faecalis	P56R1A	Lactococcus lactis	P56M2	Leuconostoc mesenteroides L. sakei	P56V2	/	P56R2	Leuconostoc lactis
				P56M1B	Leuconostoc mesenteroides	P56V1B	Enterococcus ssp.	P56R1B	/						
				P56M1C	L. sakei	P56V1C	Enterococcus ssp.	P56R1C	/						
				P56M1D	L. viridescens	P56V1D	Enterococcus ssp.	P56R1D	Enterococcus ssp.						
				P56M1E	Leuconostoc mesenteroides	P56V1E	/	P56R1E	Enterococcus ssp.						
				P56M1F	Leuconostoc mesenteroides			P56R1F	Enterococcus ssp.						
				P56M1G	Leuconostoc mesenteroides										
P57	3 * 10 ³	4 * 10 ⁴	> 3 * 10 ⁶	P57M1A	Streptococcus mitis	P57V1A	L. fermentum	P57R1A	L. plantarum	P57M2	/	P57V2	/	P57R2	L. sakei L. casei/L. paracasei Carnobact. divergens
				P57M1B	/	P57V1B	E. faecalis	P57R1B	/						
				P57M1C	/	P57V1C	E. faecalis	P57R1C	L. plantarum						
				P57M1D	/	P57V1D	Enterococcus ssp.								
				P57M1E	/	P57V1E	Enterococcus ssp.								
				P57M1F	/	P57V1F	Enterococcus ssp.								
				P57M1G	Enterococcus ssp.										
P58	3,0 * 10 ⁵	1,9 * 10 ⁵	8 * 10 ³	P58M1C	Streptococcus mitis	P58V1A	Streptococcus agalactiae	P58R1A	L. paracasei	P58M2	L. casei/ L. paracasei	P58V2	L. casei/ L. paracasei	P58R2	L. casei/ L. paracasei
				P58M1D	Enterococcus ssp.	P58V1B	/	P58R1B	Enterococcus ssp.						
				P58M1E	Enterococcus ssp.	P58V1C	/	P58R1D	/						
						P58V1D	/	P58R1E	/						
						P58V1E	/	P58R1F	Enterococcus ssp.						
						P58V1F	Enterococcus ssp.								
P59	2,4 * 10 ⁶	0	6 * 10 ²	P59M1A	keine DNA			P59R1A	/	P59M2	L. casei/ L. paracasei	P59V2	L. casei/ L. paracasei	P59R2	L. casei/ L. paracasei
				P59M1F	/			P59R1B	Enterococcus ssp.						
								P59R1C	/						
								P59R1D	/						
								P59R1E	/						
								P59R1G	/						
P60	4,8 * 10 ⁵	3,5 * 10 ³	3 * 10 ³	P60M1A	Streptococcus salivarius	P60V1A	E. faecalis	P60R1A	E. faecalis	P60M2	L. casei/ L. paracasei	P60V2	L. casei/ L. paracasei	P60R2	L. casei/ L. paracasei
				P60M1B	/			P60R1B	/						
				P60M1C	Enterococcus ssp.			P60R1C	E. faecalis						
				P60M1D	/			P60R1D	/						
				P60M1E	/			P60R1E	/						
				P60M1F	Enterococcus ssp.			P60R1G	E. faecalis						
				P60M1G	/										

9.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1: Sequenzen der verwendeten Primer [WALTER et al., 2001]	28
Tab. 3-2: PCR-Programme der verwendeten Primer, 30 Zyklen [WALTER et al., 2001]	28
Tab. 3-3: Sequenzen der Multiplex-Primer [SONG et al., 2000]	28
Tab. 3-4: Temperaturabfolge der Multiplex-PCR, 35 Zyklen [SONG et al., 2000]	28
Tab. 3-5: Einteilung der Lactobacillen in Gruppen, [SONG et al., 2000].....	29
Tab. 3-6: Primer für <i>Lactobacillus jensenii</i> . Positivkontrolle: DSM 20557, ATCC 25258	29
Tab. 3-7: Primer für <i>Lactobacillus acidophilus</i> . Positivkontrolle: DSM 20079, ATCC 4356	30
Tab. 3-8: Primer für <i>Lactobacillus crispatus</i> . Positivkontrolle: DSM 20584, ATCC 33820.....	30
Tab. 3-9: Primer für <i>Lactobacillus gasseri</i> . Positivkontrolle: DSM 20243, ATCC 33323	30
Tab. 3-10: Primer für <i>Lactobacillus paracasei</i> . Positivkontrolle: DSM 5622	30
Tab. 3-11: Primer für <i>Lactobacillus rhamnosus</i> . Positivkontrolle: LMG 6400	30
Tab. 3-12: Primer für <i>Lactobacillus salivarius</i> . Positivkontrolle: DSM 20555, ATCC 11741,	31
Tab. 3-13: Primer für <i>Lactobacillus reuteri</i> . Positivkontrolle: DSM 20016, ATCC 23272	31
Tab. 3-14: Primer für <i>Lactobacillus plantarum</i> . Positivkontrolle: DSM 20174, ATCC 14917	31
Tab. 3-15: Primer für <i>Lactobacillus fermentum</i> . Positivkontrolle: DSM 20052, ATCC 14931,	31
Tab. 3-16: Primer für <i>Enterococcus spp.</i> Positivkontrolle: DSM 2918	32
Tab. 3-17: PCR-Programme der verwendeten Primer, 35 Zyklen [RINTTILÄ et al., 2004]	32
Tab. 3-18: Primer für <i>E. faecalis</i> und <i>E. faecium</i> Multiplex-PCR. Positivkontrolle: DSM 20478, ATCC 19433, DSM 2918.....	32
Tab. 3-19: PCR-Programme der verwendeten Primer, 30 Zyklen [DUTKA-MALEN et al., 2004]	32
Tab. 3-20: Einwaage Agarosegel für ein 2 %iges Gel.....	36
Tab. 3-21: Menge an Laufpuffer nach Gelgröße	36
Tab. 3-22: Spannungswerte Elektrophorese	37
Tab. 3-23: Zusammensetzung der Gradientenlösungen.....	41
Tab. 4-1: Keimzahlen auf MRS-Agar.....	45
Tab. 4-2: Alle identifizierten Isolate der Keimzahlbestimmung.....	75
Tab. 4-3: Alle identifizierten Isolate der Keimzahlbestimmung (keine Mehrfachzählung pro Keimzahlbestimmung)	76
Tab. 4-4: Sequenzierungsergebnisse.....	79
Tab. 4-5: Übersicht über die als Enterococcen identifizierten Isolate.	81
Tab. 4-6: Typstämme, aus denen sich der Marker zusammensetzt.	85
Tab. 4-7: Sequenzierungsergebnisse von Gel 1	88
Tab. 4-8: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 1 und Marker.....	88
Tab. 4-9: Sequenzierungsergebnisse von Gel 2	90
Tab. 4-10: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 2 und Marker.....	90
Tab. 4-11: Sequenzierungsergebnisse von Gel 3	92
Tab. 4-12: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 3 und Marker.....	92
Tab. 4-13: Sequenzierungsergebnisse von Gel 4	94
Tab. 4-14: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 4 und Marker.....	94

Tab. 4-15: Sequenzierungsergebnisse von Gel 5.....	96
Tab. 4-16: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 5 und Marker	96
Tab. 4-17: Sequenzierungsergebnisse von Gel 6.....	98
Tab. 4-18: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 6 und Marker	98
Tab. 4-19: Sequenzierungsergebnisse von Gel 7.....	100
Tab. 4-20: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 7 und Marker	100
Tab. 4-21: Sequenzierungsergebnisse von Gel 8.....	102
Tab. 4-22: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 8 und Marker	102
Tab. 4-23: Sequenzierungsergebnisse von Gel 9.....	104
Tab. 4-24: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 9 und Marker	104
Tab. 4-25: Sequenzierungsergebnisse von Gel 10.....	106
Tab. 4-26: Ergebnisse durch Vergleich mit Sequenzierungsergebnissen von Gel 10 und Marker	106
Tab. 4-27: Diversitätsanalyse durch PCR-DGGE	107
Tab. 5-1: Verteilung der kulturellen Isolate auf Abstrichsorte und <i>Lactobacillus</i> -Arten. [KRONDORFER, 2008].....	112
Tab. 5-2: Verteilung der durch PCR-DGGE erhaltenen Isolate auf Abstrichsorte und <i>Lactobacillus</i> -Arten und anderen identifizierten Arten. [KRONDORFER, 2008].....	113
Tab. 5-3: H ₂ O ₂ -Produktion von Lactobacillen. [ESCHENBACH et al., 1989; OCANA et al., 1999; ROCHAT et al., 2006; SONG et al., 1999; STRUS et al., 2006].....	115
Tab. 5-4: Verteilung der kulturellen Isolate auf Abstrichsorte und <i>Lactobacillus</i> -Arten.	116
Tab. 5-5: Verteilung der durch PCR-DGGE erhaltenen Isolate auf Abstrichsorte und <i>Lactobacillus</i> -Arten.	118
Tab. 5-6: Vergleich der kulturell erhaltenen oralen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen.....	120
Tab. 5-7: Vergleich der oralen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen.....	122
Tab. 5-8: Vergleich der kulturell erhaltenen rektalen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen.....	124
Tab. 5-9: Vergleich der rektalen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen.....	126
Tab. 5-10: Vergleich der kulturell erhaltenen vaginalen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen.....	128
Tab. 5-11: Vergleich der vaginalen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen.....	130
Tab. 5-12: Zusammenhang der besiedelten Abstrichsorte als Zahlen und in Prozent (bezogen auf alle postmenopausalen Probandinnen)	132
Tab. 5-13: Verteilung der Lactobacillusarten, identifiziert durch Art-spezifische PCR in Prozent bei den schwangeren und postmenopausalen Frauen (bezogen auf alle Probandinnen)	133
Tab. 5-14: Verteilung der Lactobacillusarten, identifiziert durch PCR-DGGE in Prozent bei den schwangeren und postmenopausalen Frauen (bezogen auf alle 30 Probandinnen)	133

9.3. *Abbildungsverzeichnis*

Abb. 3-1.: Prinzip der Polymerase Kettenreaktion [WILHELM, 2005]	25
Abb. 3-2: 100 bp-DNA-Marker DNA ladder 100 bp plus (AppliChem GmbH)	33
Abb. 4-1: Keimzahlen der Proben P31 – P40 im Gegenüberstellung der Ergebnisse von Mund, Vagina und Rektum.	47
Abb. 4-2: Keimzahlen der Proben P41 – P50 im Gegenüberstellung der Ergebnisse von Mund, Vagina und Rektum.	47
Abb. 4-3: Keimzahlen der Proben P51 – P60 im Gegenüberstellung der Ergebnisse von Mund, Vagina und Rektum.	48
Abb. 4-4: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P31M1A-P33M1B	50
Abb. 4-5: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P33M1C-P34R1C	50
Abb. 4-6: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P35V1A; P40M1A-P42R1C	51
Abb. 4-7: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P42R1D-P42V1D	51
Abb. 4-8: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P36R1A-P38R1E	52
Abb. 4-9: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P39R1A-P39V1B	52
Abb. 4-10: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P43M1A-P45R1B.....	53
Abb. 4-11: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P45R1C-P47V1E	53
Abb. 4-12: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate 48M1A-P49M1C.....	54
Abb. 4-13: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate 49M1D-P50V1D	54
Abb. 4-14: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P50V1E-P52M1B	55
Abb. 4-15: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P52M1D-P52R1E.....	55
Abb. 4-16: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P53M1A-P54R1C.....	56
Abb. 4-17: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P54R1D-P55R1A	56
Abb. 4-18: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P55R1B-P55R1F	57
Abb. 4-19: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P56M1A-P57M1D	57
Abb. 4-20: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P57M1E-P58R1A.....	58
Abb. 4-21: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P58R1B-P60M1D.....	58
Abb. 4-22: Gattungs-spezifische PCR der kulturellen Isolate P60M1E-P60R1G	59
Abb. 4-23: Multiplex PCR der kulturellen Isolate P31M1B-P33V1A	60
Abb. 4-24: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P33V1B-P33R1B.....	61
Abb. 4-25: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P33R1C-P35V1A und P40M1A-P40M1E	61
Abb. 4-26: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P40M1F-P42V1D und P36R1A-P38R1A	62
Abb. 4-27: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P38R1B-P39V1B.....	62
Abb. 4-28: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P43M1A-P45M1B.....	63
Abb. 4-29: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P45M1C-P47V1E	63
Abb. 4-30: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P50M1C-P55R1A.....	64
Abb. 4-31: Multiplex-PCR der kulturellen Isolate P56M1B-P60R1C	64
Abb. 4-32: Art-spezifische Multiplex-PCR II-1 und II-2 der kulturellen Isolate P32M1A-P35V1A	67
Abb. 4-33: Art-spezifische Multiplex-PCR II der kulturellen Isolate P45V1B und P47V1E	67
Abb. 4-34: Art-spezifische Multiplex-PCR II der kulturellen Isolate P55V1A und P55V1C	68

Abb. 4-35: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P31V1B-P33V1B.....	69
Abb. 4-36: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P31R1C-P34R1C	69
Abb. 4-37: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P40M1A-P42V1D und P36V1A-P36R1A	70
Abb. 4-38: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P43M1A-P44R1D.....	70
Abb. 4-39: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P50M1C-P55R1A.....	71
Abb. 4-40: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P57V1C-P60R1C	71
Abb. 4-41: Art-spezifische Multiplex-PCR IV der kulturellen Isolate P31V1C-P33R1A	72
Abb. 4-42: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P34V1C-P42V1D	73
Abb. 4-43: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P52R1E-P55R1A	73
Abb. 4-44: Art-spezifische Multiplex-PCR III der kulturellen Isolate P57V1A-P60R1C	74
Abb. 4-45: Verteilung der identifizierten Isolate auf die einzelnen Arten.	75
Abb. 4-46: Verteilung der identifizierten Isolate auf die einzelnen Arten, jede Art pro Abstrich nur 1x berücksichtigt.....	77
Abb. 4-47: Verteilung der identifizierten oralen Isolate auf die einzelnen Arten.	77
Abb. 4-48: Verteilung der identifizierten rektalen Isolate auf die einzelnen Arten.	78
Abb. 4-49: Verteilung der identifizierten vaginalen Isolate auf die einzelnen Arten.....	78
Abb. 4-50: DGGE-Marker aus Lactobacillus-Typstämmen.....	86
Abb. 4-51: DGGE-Gel 1 der Proben P31M2, P31V2, P31R2, P32M2, P32V2, P32R2, P33M2, P33V2 und P33R2.....	87
Abb. 4-52: DGGE-Gel 2 der Proben P34M2, P34V2, P34R2, P35M2, P35V2, P35R2, P36M2, P36V2 und P36R2.....	89
Abb. 4-53: DGGE-Gel 3 der Proben P37M2, P37V2, P37R2, P38M2, P38V2, P38R2, P39M2, P39V2 und P39R2.....	91
Abb. 4-54: DGGE-Gel 4 der Proben P40M2, P40V2, P40R2, P41M2, P41V2, P41R2, P42M2, P42V2 und P42R2.....	93
Abb. 4-55: DGGE-Gel 5 der Proben P43M2, P43V2, P43R2, P44M2, P44V2, P44R2, P45M2, P45V2 und P45R2.....	95
Abb. 4-56: DGGE-Gel 6 der Proben P46M2, P46V2, P46R2, P47M2, P47V2, P47R2, P48M2, P48V2 und P48R2.....	97
Abb. 4-57: DGGE-Gel 7 der Proben P49M2, P49V2, P49R2, P50M2, P50V2, P50R2, P51M2, P51V2 und P51R2.....	99
Abb. 4-58: DGGE-Gel 8 der Proben P52M2, P52V2, P52R2, P53M2, P53V2, P53R2, P54M2, P54V2 und P54R2.....	101
Abb. 4-59: DGGE-Gel 9 der Proben P55M2, P55V2, P55R2, P56M2, P56V2, P56R2, P57M2, P57V2 und P57R2.....	103
Abb. 4-60: DGGE-Gel 10 der Proben P58M2, P58V2, P58R2, P59M2, P59V2, P59R2, P60M2, P60V2 und P60R2.....	105
Abb. 4-61: Verteilung der mittels DGGE identifizierten Arten.	107
Abb. 4-62: Verteilung der mittels DGGE identifizierten oralen Arten.	108
Abb. 4-63: Verteilung der mittels DGGE identifizierten rektalen Arten.	109

Abb. 4-64: Verteilung der mittels DGGE identifizierten vaginalen Arten.	109
Abb. 5-1: Verteilung der mittels Kultivierung identifizierten Arten der schwangeren Probandinnen. .	112
Abb. 5-2: Verteilung der mittels PCR-DGGE identifizierten Arten der schwangeren Probandinnen. .	113
Abb. 5-3: Verteilung der kultivierten und identifizierten Arten der postmenopausalen Probandinnen	116
Abb. 5-4: Verteilung der mittels PCR-DGGE identifizierten Arten der postmenopausalen Probandinnen.	119
Abb. 5-5: Vergleich der kulturell erhaltenen oralen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen.....	121
Abb. 5-6: Vergleich der kulturell erhaltenen oralen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen in anderer graphischer Darstellung	121
Abb. 5-7: Vergleich der oralen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen.....	123
Abb. 5-8: Vergleich der oralen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen in anderer graphischer Darstellung	123
Abb. 5-9: Vergleich der kulturell erhaltenen rektalen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen.....	125
Abb. 5-10: Vergleich der kulturell erhaltenen rektalen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen in anderer graphischer Darstellung	125
Abb. 5-11: Vergleich der rektalen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen.....	127
Abb. 5-12: Vergleich der rektalen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen in anderer graphischer Darstellung	127
Abb. 5-13: Vergleich der kulturell erhaltenen vaginalen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen.....	129
Abb. 5-14: Vergleich der kulturell erhaltenen vaginalen Isolate zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen in anderer graphischer Darstellung	129
Abb. 5-15: Vergleich der vaginalen Proben der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen.....	131
Abb. 5-16: Vergleich der vaginalen Ergebnisse der PCR-DGGE zwischen schwangeren und postmenopausalen Probandinnen in anderer graphischer Darstellung	131

Lebenslauf

Persönliche Information

- Name: Cathrin Janitschek
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: Österreich
- Geburtsdatum: 26.02.1983
- Geburtsort: Klagenfurt

Ausbildung

- Seit 10/2001 Uni Wien 1090 Wien
Studium der Biologie – Studiengang: Mikrobiologie / Genetik
- 1993 - 2001 Ingeborg Bachmann Gymnasium 9020 Klagenfurt
 - 19. Juni 2001 Reifeprüfung

Tätigkeiten neben dem Studium

- 12/2009 – 06/2010 Tutorin an der BOKU Wien
- 07/2005 Praktikum in der Abt. Labordiagnostik des SMZ Süd
- 04 – 06/2004 Kundenberatung – Fa. Tango GmbH
- 07/2002 Datenerfassung und -auswertung – Kärntner Linien
- 07/2000 Administration – Kärntner Gebietskrankenkasse
- 07/1999 Administration – Kärntner Gebietskrankenkasse

Besondere Interessen

- Seit 09/1998 Klassische Gesangsausbildung – Konservatorium
- 1995 – 2001 Klavierausbildung – Musikschule Klagenfurt

Kenntnisse

- Sprachen: Englisch, Italienisch Maturaniveau
Französisch Grundlagen
- Computer: Windows XP, MS Office, Internetanwendungen